

10000个科学难题

10000 Selected Problems in Sciences

医学卷

Medicine

"10000个科学难题"医学编委会



"十一五"国家重点图书出版规划项目

10000 个科学难题

10000 Selected Problems in Sciences

医 学 卷

Medicine

"10000 个科学难题"医学编委会

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书是教育部、科学技术部、中国科学院和国家自然科学基金委员会联合组织开展的“10000个科学难题”征集活动的重要成果，书中的难题均由国内外知名的医学领域的专家撰写。书中收集了有关基础医学、临床医学、预防医学、药学和中医学五个方面的大量难题与重要问题。

本书可供高等院校和科研单位医学领域的研究生、科研人员阅读参考，也可供对医学感兴趣的其他读者阅读。有兴趣的读者可以在此基础上就其中的某一问题进行深入探索和研究，一些研究生也可以在导师的指导下选择其中的某一问题作为自己的研究课题。

图书在版编目（CIP）数据

10000个科学难题·医学卷／“10000个科学难题”医学编委会编．—北京：科学出版社，2011.8

“十一五”国家重点图书出版规划项目

ISBN 978-7-03-031949-4

Ⅰ.1… Ⅱ.1… Ⅲ.①自然科学-普及读物②医学-普及读物 Ⅳ.①N49②R-49

中国版本图书馆CIP数据核字（2011）第153554号

责任编辑：沈红芬／责任校对：林青梅　宋玲玲

责任印制：刘士平／封面设计：陈　敬

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码：100717

http：//www．sciencep．com

北京天时彩色印刷有限公司　印刷

科学出版社发行　各地新华书店经销

*

2011年8月第　一　版　　开本：B5（787×1092）

2011年8月第一次印刷　　印张：77　1/2

印数：1—4 000　　字数：1 560 000

定价：298.00元

（如有印装质量问题，我社负责调换）

“10000 个科学难题”征集活动领导小组名单

组　长　杜占元　王伟中　李静海　孙家广

副组长　钟　掘

成　员　（按姓氏拼音排序）

韩　宇　孟宪平　王延觉　吴学梯　张先恩　张尧学

赵玉海　周德进

“10000 个科学难题”征集活动领导小组办公室名单

主　任　雷朝滋

成　员　（按姓氏拼音排序）

马晋并　吴晓东　鄢德平　朱蔚彤　朱小萍

“10000 个科学难题”征集活动专家指导委员会名单

主　任　钟　掘　赵沁平　刘燕华

副主任　李家洋　赵忠贤　孙鸿烈

委　员　（按姓氏拼音排序）

白以龙　陈洪渊　陈佳洱　程国栋　崔尔杰　冯守华

冯宗炜　符淙斌　葛墨林　郝吉明　贺福初　贺贤土

黄荣辉　金鉴明　李　灿　李培根　林国强　林其谁

刘嘉麒　马宗晋　欧阳自远　强伯勤　田中群　汪品先

王　浩　王静康　王占国　王众托　吴常信　吴良镛

夏建白　项海帆　徐建中　杨　乐　张　泽　张继平

张亚平　郑南宁　郑树森　周炳琨　周秀骥　朱作言

左铁镛

“10000个科学难题”医学编委会名单

努力攻克医学难题
甘当百姓健康卫士

桑國卫

辛卯六月 汪庄

《10000 个科学难题》序

爱因斯坦曾经说过“提出一个问题往往比解决一个问题更为重要”。在许多科学家眼里，科学难题正是科学进步的阶梯。1900 年 8 月德国著名数学家希尔伯特在巴黎召开的世界数学家大会上提出了 23 个数学难题。在过去的 100 多年里，希尔伯特的 23 个问题激发了众多数学家的热情，引导了数学研究的方向，对数学发展产生的影响难以估量。

其后，许多自然科学领域的科学家们陆续提出了各自学科的科学难题。2000 年初，美国克雷数学研究所选定了 7 个“千禧年大奖问题”，并设立基金，推动解决这几个对数学发展具有重大意义的难题。几年前，中国科学院编辑出版了《21 世纪 100 个交叉科学难题》，在宇宙起源、物质结构、生命起源和智力起源四大探索方向上提出和整理了 100 个科学难题，吸引了不少人的关注。

科学发展的动力来自两个方面，一是社会发展的需求，另一个就是人类探索未知世界的激情。随着一个又一个科学难题的解决，科学技术不断登上新的台阶，推动着人类社会的发展。与此同时，新的科学难题也如沐雨春笋，不断从新的土壤破土而出。一个公认的科学难题本身就是科学研究的结果，同时也是开启新未知大门的密码。

《国家中长期科学和技术发展规划纲要（2006～2020 年）》提出建设创新型国家的战略目标，加强基础研究，鼓励原始创新是必由之路。为了引导科学家们从源头上解决科学问题，激励青年才俊立志基础科学研究，教育部、科学技术部、中国科学院和国家自然科学基金委员会决定联合开展“10000 个科学难题”征集活动，系统归纳、整理和汇集目前尚未解决的科学难题。根据活动的总体安排，首先在数学、物理学和化学三个学科试行，根据试行的情况和积累的经验，再陆续启动天文学、地球科学、生物学、农学、医学和信息科学等学科领域的难题征集活动。

征集活动成立了领导小组、领导小组办公室，以及由国内著名专家组成的专家指导委员会和编辑委员会。领导小组办公室公开面向高等学校、科研院所、学术机构以及全社会征集科学难题；编辑委员会讨论、提出和组织撰写骨干问题，并对征集到的科学问题进行严格遴选；领导小组和专家指导委员会最后进行审核并出版《10000 个科学难题》系列丛书。这些难题汇集了科学家们的知识和智慧，凝聚了参与编写的科技工作者的心血，也体现了他们的学术风尚和科学责任。

开展“10000 个科学难题”征集活动是一次大规模的科学问题梳理工作，把

尚未解决的科学难题分学科整理汇集起来，呈现在人们面前，有利于加强对基础科学研究的引导，有利于激发我国科技人员，特别是广大博士、硕士研究生探索未知、摘取科学明珠的激情，而这正是我国目前基础科学研究所需要的。此外，深入浅出地宣传这些科学难题的由来和已有过的解决尝试，也是一种科学普及活动，有利于引导我国青少年从小树立献身科学、做出重大科学贡献的理想。

分学科大规模开展“10000 个科学难题”征集活动在我国还是第一次，难免存在疏漏和不足，希望广大科技工作者和社会各界继续支持这项工作。更希望我国专家学者，特别是青年科研人员持之以恒地解决这些科学难题，开启未知的大门，将这些科学明珠摘取到我国科学家手中。

2008 年 12 月

序　　言

社会的发展，是人类和自然界斗争并求得和谐的历史；一部医学史，就是人类对疾病进行不断的认识和斗争的历史。随着社会经济、科技的进步发展，医学也不断进展，新的难题也不断产生。癌症、艾滋病等难题尚未攻克，SARS、超级细菌等难题又接踵而至。医乃仁术，医学科技工作者都希望攻克这些难题，努力提高全人类的医疗水平和生活质量。

根据统计，SCI 数据库 2009 年收录的中国科技论文数已占世界份额的 8.8% ,列第 2 位。毋庸讳言，今天的中国科学家在国际学术界已经是一支重要的力量。我国的医学科技工作者也理应在解决困扰全人类的医学难题领域有所建树。为此，亟须将医学领域的难题做一整理，以指引我国医学科技工作者对此进行攻关，裨益人民健康福祉。

教育部、科学技术部、中国科学院和国家自然科学基金委员会联合开展了“10000 个科学难题”征集活动，系统归纳、整理和汇集目前尚未解决的科学难题，其中医学领域的难题征集活动已经完成，《10000 个科学难题・医学卷》即将出版。该书的出版，为我国医学科技工作者提供了梳理医学难题的机会，使其对医学的难题有一个整体、宏观的认识。

医学领域的难题编撰这项浩大的工程由浙江大学医学院附属第一医院李兰娟院士担任编委会主任，董尔丹教授、王陇德院士、饶子和院士、郑树森院士、陈志南院士、张伯礼院士等 6 位专家担任编委会副主任，共 17 位两院院士在内的 59 位医学领域顶尖专家担纲，对难题编撰进行层层把关。他们都是活跃在全国各地医疗科研一线的专家，对各自研究领域的难题提出了精辟和独到的见解，使该书具有很高的学术价值。

该书的撰写瞄准学术前沿，从引人关注的问题入手，深入浅出地阐述其中深奥的科学理论和难点，提出解决难题的可能出路，图文并茂，通俗易懂，力求做到科学性和可读性的完美结合。而某些交叉学科，难题由不同学科的专家共同编写，从不同角度加以阐释，对医学最前沿、最热点的难题进行了系统而严谨的梳理和概括，全面地展示了难题的精髓。更值得欣喜的是，听闻该书的编写过程中，不同领域的专家相互交流，促成了多个合作，共同攻克难题。

“10000 个科学难题”征集活动是前所未有的创举，《10000 个科学难题・医学卷》是医学领域难题征集活动的重要成果。热烈祝贺该书的出版，同时对编委

会的院士、专家，对难题的撰稿人和提供难题的学者们致敬，衷心感谢他们对我国医学学科发展所做的贡献。该书的出版，必将激励我国医学科技人员，特别是包括广大博士后、博士研究生在内的青年科技工作人员献身医学、攻克医学难题的决心和勇气，为建设创新型国家奉献自己的力量。

2011 年 2 月

前　　言

医学是以治疗、预防生理疾病和提高人体健康为目的的一种科学，可分为现代医学（即通常说的西医学）和传统医学（包括中医学、藏医学、蒙医学）等多种医学体系。医学的历史十分悠久，生老病死是人类社会中永恒的医学主题。由于医学的服务对象是人，因此与每个人的生活均密切相关。而且由于人体的复杂性，医学需解决而未解决的难题比比皆是，如众所周知的癌症的诊断和治疗、艾滋病的治疗等。另外，随着现代生活模式的改变和医学专业化程度的细分，新的难题也随之产生。例如，最近几年有抬头趋势的结核病，如何应用分子生物学、代谢组学等手段对其进行早期诊断成为一个棘手的难题；抗生素的滥用带来抗生素的耐药，甚至产生无药可治的超级抗病菌，如何控制耐药菌的产生并从根本上解决细菌耐药的问题亦是严峻的挑战。虽然医学领域难题众多且与民生息息相关，但世界范围内尚未对此进行系统的梳理和编辑成册。

《国家中长期科学和技术发展规划纲要（2006～2020年）》提出建设创新型国家的战略目标，加强基础研究、鼓励原始创新是必由之路。为了进一步贯彻落实科教兴国战略和人才强国战略，为建设创新型国家提供强大的人才支持和知识贡献，教育部、科学技术部、中国科学院和国家自然科学基金委员会联合开展“10000个科学难题”征集活动，系统归纳、整理和汇集目前尚未解决的科学难题，具有重大的科学意义。医学难题的征集活动为从全局角度思考医学所面临的巨大挑战提供了宝贵的契机。

根据四部委的部署，“10000个科学难题”医学领域的征集活动由浙江大学牵头，编委会由包括17位两院院士在内的59位医学领域著名专家组成。难题涵盖基础医学、临床医学、药学、预防医学、中医学五大医学领域，并按照在此五大领域下再细分的原则进行难题征集和撰写，力争将医学领域最具有代表性的难题包含在内。在三个多月的时间内，共征集到难题628题，经层层筛选和把关后，最终入选的难题为356题，这些难题全部由各医学领域著名专家撰写。

在难题的编撰过程中，编委会多次召开会议，严格把关、统一思想。每个难题着重介绍问题的来龙去脉，同时强调难题的难点所在和潜在的突破口，努力做到“研究生可选题，大学生能通读，高中生有兴趣”。由于本书的编写和其他几册平行或交叉进行，特别由于医学与生物学有密切的相关性，本书和生物卷难免有部分交叉之处，编委会已从选题和侧重点上加以考虑。另外，由于医学的浩瀚繁轶，本书不可能包含所有难题，希望有机会补充和再版。

最后，我们感谢热心撰写难题的学者们，也真诚地感谢教育部科技委、科学

出版社和浙江大学的大力支持。希望本书能对激发广大医学工作者不断攻克一个又一个医学难题、提高我国医学科学自主创新能力起到一些有益的作用，更希望本书能在普及医学科学知识、激发青少年热爱医学科学的兴趣、培养探索医学未知世界的好奇心等方面尽绵薄之力。

李兰娟代表编委会谨识

2010 年 12 月

目　　录

临床医学篇

预防医学篇

药　学　篇

中医学篇

基础医学篇

免疫记忆是如何形成的

How Is Immunological Memory Generated

众所周知，学习与记忆是人类高级神经活动的重要特征，人类优越于其他动物的重要原因是具有更强的学习与记忆能力。机体的免疫系统在识别“自我”与“非我”中发挥至关重要的作用；同样地，它们也存在着记忆，即免疫系统能够在很长时间甚至一生之中记住它们所遭遇到的病原体，这是免疫系统的一大特征，称为“免疫记忆”。顾名思义，免疫记忆是指机体在初次感染病原体后对其识别并做出应答，同时记住该病原体，当机体再次遭遇同一病原体时，机体会快速激发起更强烈的细胞与体液免疫应答，从而清除入侵的病原体。免疫记忆在机体抵抗外源病原体的感染中发挥重要作用，在人类与自然界各种病原体抗争的漫漫历史长河中所发现的疫苗接种防治病原体的方法，正是通过诱导免疫记忆来实现的。因此，是否能够诱导有效的免疫记忆就成为疫苗接种成功与否的关键。此外，免疫记忆在机体对抗肿瘤的过程中也具有重要的意义。而在自身免疫性疾病与器官移植过程中，免疫记忆可加重机体的病理损伤。因此，正确调控免疫记忆的形成及强弱对机体就显得尤为重要，这也是免疫学家们普遍关注的问题和亟待解决的科学难题。

公元前 430 年，古希腊历史学家修西得底斯（Thucydides）首先记载了“免疫记忆”现象，其在描述瘟疫时写到：“同一个人决不会受到同一病原体的两次攻击。”公元 303 年，我国晋代科学家葛洪在其著作《肘后备急方》中记载了采取“以毒攻毒”的方法治疗狂犬病，即把狂犬杀掉，使用含有狂犬病毒的犬脑浆涂于被狂犬咬伤处，治愈后不再发病。公元 1000 年左右，中国已开始有接种“人痘”预防天花的记载，即将来自感染天花的恢复期患者的痂皮制成的粉末接种到健康人鼻内来预防天花。由于接种“人痘”存在感染天花的危险，且病死率高，因此未能得到推广。直到公元 1798 年，英国乡村医生爱德华·詹纳（Edward Jenner）发明了“牛痘”接种法预防天花，从而最终导致天花的灭绝，这是人类史上征服疾病最辉煌的成绩。疫苗接种在人类预防和控制传染病上具有无可替代的地位，而疫苗接种的理论基础是免疫记忆。直至今日，最成功的那些疫苗主要是根据经验而开发出来的，而对其潜在的免疫学机制却知之甚少。因此，随着现代免疫学的进一步发展，以及人们对免疫记忆形成机制的深入研究，将会促进更多有效的疫苗被开发出来，从而在人类征服艾滋病、慢性肝炎、结

核、疟疾、肿瘤等方面取得最后的成功。

免疫系统在一生中如何记住病原体？免疫记忆的细胞与分子机制是什么？免疫记忆细胞是哪些细胞，其分化发育如何？免疫记忆如何长期维持及免疫记忆细胞如何长期存活并在机体内定位于何处？为何在再次免疫应答时记忆细胞能够更快更强地做出反应，其内在的分子机制又是什么？免疫应答时为什么保护性免疫在有些感染中是长期存在的，而在其他感染中是短期的？何时免疫失败，而且该如何解释？这些问题吸引着免疫学家很多年，而且这些核心问题的答案正开始出现。尽管已有研究证明固有免疫细胞之一的自然杀伤细胞也具有记忆细胞的特征，但目前研究表明，免疫记忆主要是由记忆性 $CD4^+$ T 细胞、记忆性 $CD8^+$ T 细胞以及记忆性 B 细胞来介导的。关于这些记忆细胞分化发育相关的细胞与分子机制的研究，就成了研究免疫记忆如何形成的重点和难点。

记忆性细胞的确定主要根据以下几点来判断：表型、功能特征及长期存活。人记忆性 T 细胞表达 CD45RO 而不表达 CD45RA。记忆性 T 细胞又可根据趋化因子受体的表达情况及效应功能特点分为效应型与中枢型记忆性 T 细胞，效应型记忆性 T 细胞不表达 CCR7，具有效应功能，而中枢型记忆性 T 细胞表达 CCR7，不具有效应功能，但在抗原刺激后可增殖并分化为效应 T 细胞。因此，关于记忆性细胞及其各种亚群的鉴定是研究热点和难点。由于 $CD4^+$ T 细胞包括 Th1、Th2、Th17、Th9、Tfh 等各种亚群，因此这些细胞相应的记忆性 $CD4^+$ T 细胞的分化发育如何被调控将是重要的，也是一大研究难点。关于记忆性 T 细胞的分化模式一直存有争议，目前认为主要包括线性分化模式、不对称分裂模式与自我更新分化模式，在不同的病原体感染条件下可能存在不同的分化模式。TCR 信号强弱、抗原刺激强弱与时间长短、共刺激信号、细胞因子、初始 T 细胞数量、表观遗传修饰是影响记忆性 T 细胞产生与性质的关键因素。固有免疫系统，包括各种 DC 亚群与模式识别受体的功能特性、NK 细胞，可影响 T 细胞与 B 细胞免疫应答的强度、时程与质量，从而进一步影响记忆性细胞的分化发育，因此固有免疫系统调控记忆性细胞的产生将是一个重点和难点。$CD4^+$ T 细胞是记忆性 $CD8^+$ T 细胞产生的重要调控因素，其内在的机制虽然已取得一些进展，包括 TRAIL 介导的细胞凋亡、CD27 信号、T-bet 下调、染色质重塑、TLR3 配体作用等，但是仍未完全弄清，也是一大研究难点。目前研究表明，IL-7 与 IL-15 均是记忆性 $CD4^+$ T 细胞与记忆性 $CD8^+$ T 细胞长期维持的重要因素，而记忆性 B 细胞长期维持的决定因素仍有待进一步研究。骨髓基质细胞既可以调控初次免疫应答的强度，也在记忆性 $CD4^+$ T 细胞的骨髓定位中发挥重要作用。这就提示基质微环境可能在记忆性细胞在各种组织中的定位与维持中发挥重要作用。将来的研究除了明确各种记忆性细胞优先的组织定位外，还需弄清相应的哪些基质微环境在其中发挥作用、其机制是什么。近年来研究表明转录因子

可调控记忆性细胞的产生，例如转录因子 FOXO3a 在人中枢型记忆性 $CD4^+$ T 细胞的存活中发挥了重要作用。这就提示调控记忆性细胞分化发育的关键转录因子的发现将是一个新的方向，也是一大研究难点。

目前临床上所广泛应用的疫苗大多是通过诱导体液免疫产生抗体来发挥作用，相信随着人们对免疫记忆形成机制的进一步解析，作用更加全面且更加有效的疫苗将被开发并用于正在影响或将要影响人类健康的各种疾病的治疗；而且正确地调控免疫记忆的形成可在治疗慢性感染与肿瘤、自身免疫性疾病与器官移植中发挥相应的作用。

参考文献

Ahmed R, Bevan MJ, Reiner SL, et al. 2009. The precursors of memory: models and controversies. Nat Rev Immunol, 9(9): 662～668

Cao X. 2008. Immunology in China: the past, present and future. Nat Immunol, 9(4): 339～342

Janssen EM, Droin NM, Lemmens EE, et al. 2005. $CD4^+$ T-cell help controls $CD8^+$ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. Nature, 434(7029): 88～93

Pulendran B, Ahmed R. 2006. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. Cell, 124(4): 849～863

Tokoyoda K, Hauser AE, Nakayama T, et al. 2010. Organization of immunological memory by bone marrow stroma. Nat Rev Immunol, 10(3): 193～200

van Grevenynghe J, Procopio FA, He Z, et al. 2008. Transcription factor FOXO3a controls the persistence of memory $CD4^+$ T cells during HIV infection. Nat Med, 14(3): 266～274

撰稿人：郭振红　许熊飞

第二军医大学

机体是如何对免疫应答进行负向调控的

Mechanism on Negative Regulation of Immune Response

对于大量入侵机体的抗原性异物，机体免疫系统通过抗原识别，免疫细胞活化、增殖、分化，以及效应细胞和分子功能发挥等一系列生理反应，最终清除异物，以维护机体内环境的稳定。此为机体的正向免疫应答，目前这一生理过程已被详细阐明。机体若产生过度的正向免疫应答，势必会对机体本身造成损伤。然而正常机体多数情况下可以通过适度的免疫应答有效清除异物而不会伤害机体本身，这说明机体内存在着负向调控系统，可以有效调节免疫应答的强度。那么，机体是通过怎样的调控系统来对免疫应答进行负向调控的呢？目前科学界对这一问题尚未有全面详尽的阐释。而免疫负向调控在维持机体内环境稳定中扮演着重要角色，调控过程中任何一个环节的失误都可能导致免疫应答的异常，出现自身免疫病、过敏等疾病。因此，对这一问题的详尽阐释不仅将有助于全面认识、理解免疫系统，也可为临床治疗免疫相关疾病提供新的思路与方法。

近年来，随着对免疫系统认识的突飞猛进，免疫负向调控的机制研究也取得了一定的进展。综合国内外现有研究成果发现，机体主要通过细胞、细胞因子及信号通路等方面对免疫应答进行负向调控。

1. 通过免疫细胞表面的抑制性受体对细胞自身的活化实施调控

T 细胞活化的第二信号（激活信号）来自协同刺激受体与其配体的结合。T 细胞组成性表达能够提供激发性第二信号的受体 CD28，其胞内段带有激活基序 ITAM（immunoreceptor tyrosine-based activation motif）。CD28 与其配体 B7（CD80/86）结合后，可通过其激活基序 ITAM 参与活化信号的传递，约 24 小时后，T 细胞表面另一带有抑制基序 ITIM（immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif）的 CTLA-4 分子被诱导性表达，因其对配体 B7（CD80/86）的结合亲和力明显高于该配体对 CD28 的亲和力，使 CTLA-4 启动的抑制信号成为强势，激活性信号转导遂告终止，T 细胞的激活因而受到有效调控（图 1）。B 细胞亦然，可通过其表面的抑制性受体 FcγR Ⅱ-B 对特异性体液应答进行调控。NK 细胞表面的抑制性受体也已被阐明。一旦抑制性受体被激活，其胞内段 ITIM 将启动有效的抑制信号，从而使激活性受体产生的正向信号被抑制，有效调控 NK 细胞的杀伤活性。

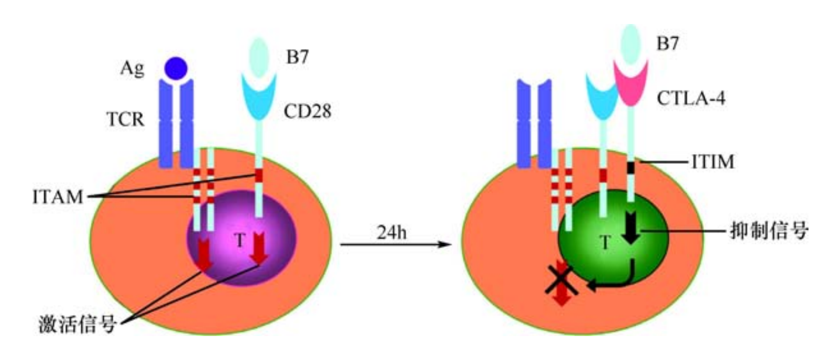


图 1　抑制性受体 CTLA-4 对 T 细胞激活的负向调节
修改自周光炎 . 2007. 免疫学原理

2. 通过调节细胞因子的产生及功能行使对免疫应答进行调控

细胞因子通过影响免疫细胞的存活、增殖、活化及功能发挥而在免疫应答中发挥着重要的作用。Jak 家族蛋白酪氨酸激酶和转录因子 STAT 是细胞因子受体相关信号转导中普遍出现的信号分子，是细胞因子能够产生并行使功能的重要方面。有多种因素对 Jak-STAT 信号途径实施负向调节，主要的调控成分为细胞因子信号转导抑制蛋白（suppressor of cytokine signaling，SOCS）。活化诱导表达的 SOCS 可遏制由 Jak-STAT 参与的细胞因子信号通路，从而制约细胞因子的功能发挥。

3. 通过活化诱导细胞死亡（activation-induced cell death，AICD）介导免疫应答的负向调控

三聚体 Fas 凋亡分子普遍表达于包括淋巴细胞在内的多种细胞表面，其与配体 FasL 的结合可启动死亡信号转导，最终引起表达 Fas 的细胞凋亡。激活的淋巴细胞特别是 CTL 和 NK 细胞可以大量表达并分泌 FasL，从而有效地以凋亡途径杀伤表达 Fas 的靶细胞。然而这些效应成分在杀伤靶细胞之后，反过来可杀伤同时表达 Fas 分子的活化淋巴细胞和 NK 细胞，构成激活诱导的细胞死亡。免疫系统通过此方式对特异性克隆容量实施收缩性调节，从而有效调控免疫应答。

4. 通过专司调节功能的细胞对免疫应答实施负向调控

近年来免疫学领域有关免疫负向调控机制研究的最大热点是 $CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$ 调节性 T 细胞（regulatory T cell，Treg）的基础与应用研究。根据诱导场所的不同，可将调节性 T 细胞分为自然调节性 T 细胞（natural Treg，nTreg）和诱导性调节性 T 细胞（induced Treg，iTreg）。前者直接从胸腺中分化而来，主要通过与靶细胞的直接接触和分泌 TGF-β、IL-10、IL-35 等细胞因子来抑制免疫应答，发挥免疫负调控作用。nTreg 主要抑制自身反应性 T 细胞应答，除了遏制自身免疫病的发生，还调控其他疾病，包括诱导移植耐受。iTreg 一般在外

周因抗原激发而产生，可以从 nTreg 分化而来，也可以来自其他初始 T 细胞。iTreg 主要依赖细胞因子发挥免疫负调控作用，可抑制自身损伤性炎症反应和移植排斥反应（图 2）。

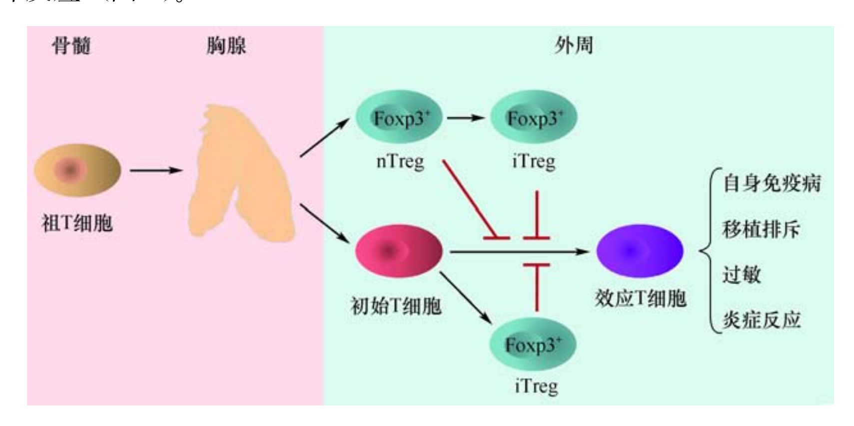


图 2　调节性 T 细胞（Treg）的分化及免疫负调控作用

对于免疫负向调控的机制研究，随着广度和深度的增加，一些新的调控元素和机制正不断被发现。然而，机体的负向免疫调控表现为复杂的、相互关联的网络系统，免疫系统如何巧妙地利用该网络系统对免疫应答进行调和以维持免疫自稳，仍是一个需要大量深入研究来加以阐明的问题。全面阐释免疫负向调控机制成为免疫学及相关研究领域的一大难题，同时也是研究的热点。新的突破点可能会在以下几个方面产生：一些新的细胞亚群及相关新分子可能是免疫负向调控机制研究的主要方向。新的细胞亚群诸如调节性树突细胞、调节性 NK 细胞等，其在免疫负向调控中所扮演的角色及发挥的作用正逐渐被阐明和丰富。新近研究表明，在 B 细胞中也存在一类具备调节功能的细胞（regulatory B cell），该类细胞可通过分泌 IL-10 发挥免疫负调控作用，遏制急性炎症反应和自身免疫病的发生。另一方面，相关新分子或原有分子新功能的发现也将有力促进免疫负向调控机制的进一步阐明。近期研究显示，小分子 RNA（microRNA）不仅在细胞发育和肿瘤发生发展中起作用，在调节免疫反应中也扮演着重要角色。

在免疫负向调控的机制研究中，新的细胞亚群及分子等调控元素、原有细胞亚群或分子新的调控功能及其之间的相互作用等纷繁而复杂，需要进行多方向、各层次的深入研究来阐明。因此，免疫负向调控的机制研究任重而道远。

参 考 文 献

曹雪涛 . 2009. 免疫学研究的发展趋势及我国免疫学研究的现状与展望 . 中国免疫学杂志，25(1):10～23

周光炎 . 2007. 免疫调节与免疫干预 . 现代免疫学 ,27(1):1～6

Adewole S Adamson , Kalonji Collins , Arian Laurence ,et al. 2009. The current STATus of lymphocyte signaling: new roles for old players . Current Opinion in Immunology ,21(2):161～166

Alexander WS. 2002. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in the immune system. Nature Reviews Immunology ,2(6):410～416

David JD , Takashi Matsushita ,Tedder TF. 2010. B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation , autoimmunity , and cancer. Ann N Y Acad Sci ,1183(2):38～57

Maria-Luisa Alegre ,Frauwirth KA ,Thompson CB. 2001. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. Nature Reviews Immunology ,1(3):220～228

Shimon Sakaguchi , Tomoyuki Yamaguchi , Takashi Nomura ,et al. 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. Cell ,133(5):775～787

Zhang J , Xu XM , Liu Y. 2004. Activation-induced cell death in T cells and autoimmunity . Cell Mol Immunol ,1(3):186～192

撰稿人:储以微　姜　佩

复旦大学

机体为何会攻击自身组织发生自身免疫性疾病

Why Their Tissues/Organs Are Attacked by Autoimmune System in Some Populations Who Have Developed Autoimmune Diseases

自身免疫性疾病（autoimmune disease）是由于自身组织和细胞受到机体内免疫系统的攻击而引起的组织损伤或器官功能紊乱。正常生理情况下，机体的免疫系统只攻击“非己”抗原，对“自我”抗原不会发生免疫攻击，即自身免疫耐受。“自我”抗原广义上指免疫系统在发育期接触的所有物质；反之，“非己”抗原是免疫系统在发育期未接触的所有物质。对“自我”抗原的低应答或无应答，是维持正常生理功能的前提。但是在一些情况下、特定的人群中，他们的免疫系统将自身的组织和细胞表面的抗原性物质识别为“非己”物质发生应答，产生针对自身组织的抗体或致敏淋巴细胞，进而发生免疫攻击而导致病理损害，引发临床症状，形成自身免疫性疾病。自身免疫性疾病与心脑血管病、糖尿病、肿瘤及哮喘都属于现代文明病，不同于其他疾病，自身免疫性疾病是涵盖面最广泛、最难以根治的一类疾病。自身免疫性疾病可以累及几乎所有的器官或组织，可以是器官特异性自身免疫病，如桥本甲状腺炎、Grave甲状腺功能亢进、胰岛素依赖型糖尿病、重症肌无力、慢性溃疡性结肠炎、恶性贫血伴慢性萎缩性胃炎、多发性脑脊髓硬化症等；也可以是系统性自身免疫病，如系统性红斑狼疮、类风湿关节炎等。

大多数自身免疫性疾病虽然不属于致死性疾病，却大大影响了人类的正常生命活动，严重降低了患者的生活质量。而且，自身免疫性疾病是难以根治的人类疾病，因为：①自身免疫性疾病属于多病因疾病，环境、遗传、人种、性别、年龄及生活方式等多种因素交织在一起；②不同自身免疫性疾病的发病机制各异，一种自身免疫性疾病可以是多种发病机制的综合产物；③自身免疫性疾病是正向免疫应答和负向免疫调控失衡的结果，免疫系统的许多分子或免疫细胞是发挥正向的免疫应答还是负向的免疫调控作用，与其发育阶段、所处微环境密切相关，并且在复杂纷繁的免疫调控网络中，常常是“牵一发而动全身”。免疫调控网络的这种特征使得目前没有一种特效药可以根治某一种自身免疫性疾病。自身免疫性疾病不但是免疫系统和免疫功能发生异常与功能紊乱的最典型代表，而且不仅仅局限于免疫系统，神经-内分泌因素、遗传因素、环境因素也影响着自身免疫性疾病的发生、发展。因此，对自身免疫性疾病的研究，不但有助于对免疫识别

和免疫调控机制的理解，还有助于理解免疫系统和体内其他系统，如神经内分泌系统之间的相互作用。

当前对自身免疫性疾病病理机制的认识可以综合为以下几种：①机体免疫系统对外界环境中“非我”抗原的免疫应答导致“旁观”损伤自身组织。这种情况最好的例子是免疫系统对异嗜性抗原的应答，通过交叉反应攻击自身组织。异嗜性抗原的特征是其他物种来源的抗原成分与机体某些组织抗原成分存在相同或相似的表位。当机体产生针对异嗜性抗原的抗体或致敏淋巴细胞时，可与自身相关组织发生交叉免疫反应，引起免疫损伤。如溶血性链球菌的胞壁成分与人类肾小球基底膜、心肌、心脏瓣膜等组织是异嗜性抗原，可以诱发抗基底膜型肾小球肾炎、风湿性心肌炎、风湿性心瓣膜炎等。②机体免疫系统失去识别“自我”和“非己”抗原的能力产生对自身抗原的免疫攻击。自身组织由于理化、微生物感染等导致自身抗原性质改变产生新的抗原决定簇，如类风湿关节炎中的类风湿因子；隐蔽抗原的释放，如甲状腺球蛋白、晶状体、精子、神经髓鞘等；机体清除免疫复合物或者凋亡坏死细胞的机制出现障碍，如缺乏补体经典途径成分 C1q、C4、C2，或者其他清道夫受体如 CR1 等。以上情况的结果是，这些自身抗原对于机体免疫系统来说是“新”抗原，激发了自身免疫应答。③对自身抗原的免疫应答和免疫调控机制失衡。正常机体存在低水平的自身免疫应答，但是其类型和强度会受到精密的负向调控。当发挥免疫负向调控功能的免疫分子和免疫细胞缺乏时就会出现自身损伤。免疫系统的不同辅助性 T 细胞（Th）亚群之间具有相互拮抗的特点，如 Th1 和 Th2 之间的相互拮抗；Treg 能够抑制 Th1、Th2 和 Th17。一种自身免疫性疾病常常是某一种 Th 应答的过度活化，如多发性硬化、炎症性肠病患者体内存在 Th1 和 Th17 的过度活化；特发性皮炎、过敏性哮喘等特应性患者体内存在 Th2 的过度活化。某一类 Th 亚群的过度活化或者是具有负向调控功能的调节性 T 细胞的数量或者功能降低，与具有免疫负调控的分子缺失/缺乏或功能异常有关，如 CTLA-4、CD32b 等。还有一种情况是免疫细胞的活化后凋亡或静息机制出现缺失/缺乏，如 FasL/Fas。控制免疫细胞活化的一个机制在于，许多免疫活化细胞自身会启动凋亡机制或者进入一种静息状态，当这种功能丢失后，过度活化的免疫细胞常常会导致自身的损伤。

作为多病因的自身免疫性疾病来说，在两个方面还存在许多的未解之谜：①病因学和病理机制；②用于临床治疗目的的药物设计。流行病学研究显示，自身免疫性疾病的发病率随着卫生条件的改善而升高，说明环境因素或者更为通俗地认为“感染”有助于减少自身免疫性疾病的发生，称为“卫生”学说。“卫生”学说认为一些病原微生物的感染可能有助于维持机体内具有负向调控功能的免疫细胞的数量，但是确切的机制还有待于进一步阐明。许多自身免疫病与遗传因素有较密切的关系，尤其是 HLA 抗原表达的类型与自身免疫性疾病有很强的关联

性，例如人类强直性脊柱炎与 HLA-B27 关系密切；北美白人中 SLE 与 HLA-DR2、DR3 有关。关于大多数的遗传背景与自身免疫性疾病，我们更多的证据只是说明其相关性，但二者之间确切的机制仍然不清楚。自身免疫性疾病的发生具有性别差异特征，如 SLE 多发于女性，男女比例达到 1∶9，并且特别多发于生育年龄，病情在月经期和妊娠期加重。而男性患强直性脊柱炎的几率要远远高于女性，男女比例为（2.5～5）∶1，这说明性激素在不同的自身免疫性疾病中发挥着重要作用。除性激素外，整个神经-内分泌系统对免疫系统的影响研究尚涉猎未深，仍有很多令人感兴趣的问题有待探索。对自身免疫性疾病，临床治疗多采用免疫抑制剂，如糖皮质激素和环磷酰胺等，但是这类药物仅仅是对症治疗，没有解决患者体内免疫调控失衡的根本因素。因此，只有深刻了解免疫负调控机制和不同自身免疫性疾病的发病机制，才有可能为临床治疗自身免疫性疾病提供药物设计靶点或者采用新型的免疫治疗手段。

参 考 文 献

Bettini M , Vignali DA. 2009. Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity. Curr Opin Immunol ,21 : 612～618

Carroll MC. 2004. A protective role for innate immunity in systemic lupus erythematosus Nat Rev Immunol ,4 : 825～831

Christensen SR , Shlomchik MJ. 2007. Regulation of lupus-related autoantibody production and clinical disease by Toll-like receptors. Seminars in Immunology ,19 :11～23

Dardalhon V , Korn T , Kuchroo VK ,et al. 2008. Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. J Autoimmun ,31 : 252～256

Kyoko Katakura , Jongdae Lee , Daniel Rachmilewitz , et al. 2005. Toll-like receptor 9-induced type I IFN protects mice from experimental colitis. J Clin Invest ,115 : 695～702

Roger PM Sutmuller , Martijn HMGM den Brok , Matthijs Kramer ,et al. 2006. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. J Clin Invest ,116 : 485～494

Theofilopoulos AN , Roberto Baccala , Bruce Beutler ,et al. 2005. Type I interferron (α/β) in immunity and autoimmunity. Annu Rev Immunol ,23 : 307～335

Wing K , Onishi Y , Prieto-Martin P ,et al. 2008. CTLA-4 control over Foxp3^{+} regulatory T cell function. Science ,322 : 271～275

撰稿人：刘书逊

第二军医大学

抗原是如何实现交叉提呈的

The Mechanisms of Antigen Cross-Presentation

免疫应答（immune response）是机体免疫系统受到抗原刺激后，抗原特异性淋巴细胞识别抗原，发生活化、增殖和分化，发挥体液免疫和细胞免疫的效应过程。特异性免疫应答是机体清除异己物质以保持内环境稳定的重要机制，这个过程是免疫系统各部分生理功能的综合体现，包括抗原提呈、淋巴细胞活化及免疫效应发生等一系列复杂而有序的反应。抗原提呈是免疫应答过程的核心环节，是机体免疫反应的始动者。在免疫应答过程中，能摄取、加工、处理抗原并将抗原信息提呈给淋巴细胞的细胞，称为抗原提呈细胞（antigen presenting cell，APC），包括树突细胞（dendritic cell，DC）、巨噬细胞、B 细胞等，在免疫应答中具有独特的地位。目前免疫学的研究对于经典的抗原提呈途径了解得比较清楚，即外源性抗原通过主要组织相容性复合体（major histocompatibility complex，MHC）Ⅱ类分子的途径被提呈，内源性抗原通过 MHC-Ⅰ类分子的途径被提呈。外源性抗原（抗原提呈细胞外的抗原，如被吞噬的细胞或细菌等）被抗原提呈细胞捕获后经吞噬、吞饮或受体介导的内吞作用进入胞内，在溶酶体或内体内被降解为抗原肽片段，与 MHC-Ⅱ类分子形成抗原肽-MHC-Ⅱ类分子复合物，转运至细胞膜，提呈给 $CD4^+$ T 细胞，也称为溶酶体提呈途径。内源性抗原(指细胞内合成的抗原，如被病毒感染细胞合成的病毒蛋白和肿瘤细胞内合成的蛋白等）被蛋白酶体降解为肽片段，由 TAP 分子（transporters associated with antigen processing）转运至内质网内，与 MHC-Ⅰ类分子结合形成抗原肽-MHC-Ⅰ类分子复合物，然后经高尔基体被运至细胞表面，提呈给 $CD8^+$ T 细胞，也称为胞质溶胶途径。

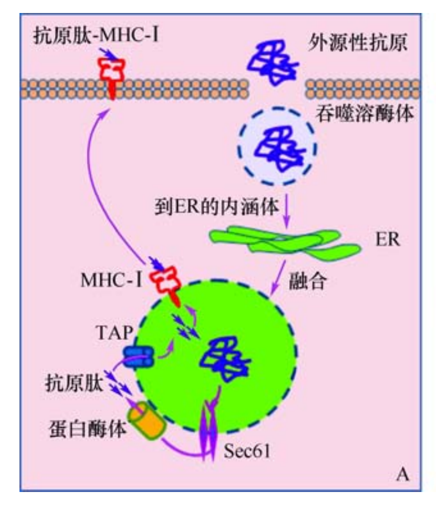
除了经典的抗原提呈途径，近年来发现一个违背经典途径的有趣现象，即机体内还存在着非经典的提呈途径。外源性抗原也可通过 MHC-Ⅰ类分子途径提呈，活化 $CD8^+$ T 细胞，这一现象称为交叉提呈（cross-presentation）。专职性 APC 如树突细胞是具有交叉提呈功能的主要细胞，树突细胞通过其表面 MHC-Ⅰ类分子对外源性抗原的交叉提呈可诱导 $CD8^+$ 细胞毒性 T 细胞。交叉提呈机制在机体抗病毒及胞内菌感染、肿瘤免疫及自身耐受中具有至关重要的作用，越来越受到关注并成为研究的热点，关于交叉提呈近年在国际顶级期刊上都有报道。理论上交叉提呈应该有两个层面的意思，即内源性抗原的 MHC-Ⅱ类提呈和外源

性抗原的 MHC-Ⅰ类提呈，不过认为外源性抗原的 MHC-Ⅰ类提呈（诱导细胞毒性 T 细胞）在对抗肿瘤与病毒性疾病中更具重要性，故对该途径提呈的机制研究得较多。已发现了一些参与交叉提呈过程的分子，但其发生的确切机制仍未完全揭开，深入阐明交叉提呈的分子机制对于开发抗肿瘤、抗感染疫苗具有重要意义。

在交叉提呈过程中，关于其发生机制有很多谜团没有解开，关键的问题主要包括：抗原肽到底是如何能够在内体与蛋白酶体之间进行非常规的转移的，是由哪些分子帮助完成的？抗原肽到底是如何与 MHC-Ⅰ类分子结合的？交叉提呈受到哪些因素的调控？什么情况下抗原会遵循交叉提呈的途径被提呈，是否跟抗原的性质有关？抗原的特点是怎么样来决定哪一条提呈途径的，还有一些什么样的因素来决定？这对于我们设计疫苗（抗病毒、抗肿瘤等）会有非常好的启发和指导作用，若能使疫苗中的免疫原同时能通过经典的 MHC-Ⅱ类分子途径提呈以活化 $CD4^+$ T 细胞，又能通过交叉提呈的途径激活 $CD8^+$ T 细胞，诱导抗原特异性 CTL，疫苗将会更加有效。

目前对于交叉提呈机制的研究只是刚刚开始，认识到外源性抗原被 MHC-Ⅰ类分子提呈的可能机制包括：APC 吞入外源抗原（胞内有病原体感染的细胞、肿瘤细胞等）后，在内体中消化，抗原肽直接与内体中的 MHC-Ⅰ类分子结合成复合物而被提呈；内体与细胞表面含 MHC-Ⅰ类分子的颗粒融合，外源性抗原肽结合再循环的 MHC-Ⅰ类分子而被提呈；含外源性抗原的吞噬溶酶体可与内质网融合，内质网膜上的 Sec61（转运分子）使吞噬溶酶体内的小分子抗原肽逆向转运至融合体的胞质面，由胞质内蛋白酶体将其进一步降解，然后在胞质中热休克蛋白（heat shock protein，HSP）家族成员 HSP70 的参与下，由内质网表面的 TAP 将抗原肽转回融合体，并装载至 MHC-Ⅰ类分子的抗原结合槽，转运至细胞膜表面被提呈给 $CD8^+$ T 细胞；内体中的外源性抗原或抗原肽还可直接进入胞质，甚至直接从细胞外进入细胞质，再经经典的 MHC-Ⅰ类途径处理和提呈，机制尚不十分明确（图 1）。热休克蛋白（包括 gp96、HSP70、HSP90 等）作为胞内含量丰富的可溶性蛋白，在参与抗原（如肿瘤）的交叉提呈中发挥重要作用。肿瘤细胞生长过程中裂解释放的 gp96-内源性抗原肽复合物可作为外源性抗原被 APC 摄取加工处理后，通过交叉提呈作用，以肿瘤抗原肽-MHC-Ⅰ类分子复合物的形式表达于 APC 表面，供细胞毒性 T 细胞识别。APC 表面 CD91 分子被证实是与 HSP 特异性结合的受体。

最近的研究还解释了自噬（autophagy）在交叉提呈中的可能作用。自噬是广泛存在于细胞中的一条胞内蛋白降解途径，在自噬过程中，待降解的细胞质组分及细胞器被包裹在一种称为自噬小体（autophagosome）的双层膜结构中，最终与溶酶体形成自噬溶酶体。自噬小体可能是供体细胞转运抗原性蛋白的有效载



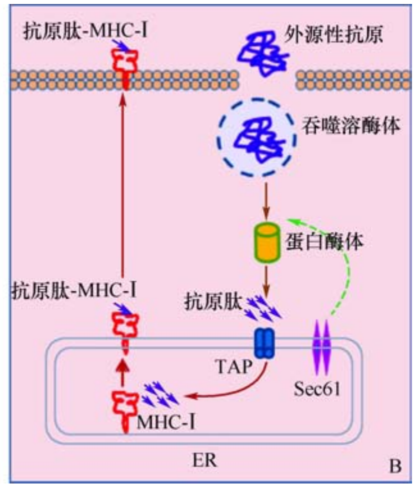


图 1　外源性抗原交叉提呈的相关机制示意

A. 含外源性抗原的吞噬溶酶体可与内质网融合，在 Sec61 协助下使吞噬溶酶体内的抗原肽逆向转运至融合体的胞质面，蛋白酶体将其进一步降解，与 MHC-Ⅰ类分子装载成复合物，转运至细胞膜表面并提呈给 $CD8^+$ T 细胞。B. 外源性抗原也可直接进入胞质中，经蛋白酶体消化，再与内质网（ER）中 MHC-Ⅰ类分子组装成复合物而被提呈

体，肿瘤细胞自噬小体可作为树突细胞交叉提呈的抗原来源，诱导强烈的抗原特异性 $CD8^+$ T 细胞应答（图 2）。胞内病原体（病毒、细菌、寄生虫）的交叉提呈机制中自噬也同样发挥作用，可以看到这些抗原往往定位在自体吞噬泡，阻断自噬就抑制了特异性 $CD8^+$ T 细胞应答。自噬还可以将内源性抗原以 MHC-Ⅱ类分子的形式提呈给 $CD4^+$ T 细胞，实现内源性抗原的交叉提呈。

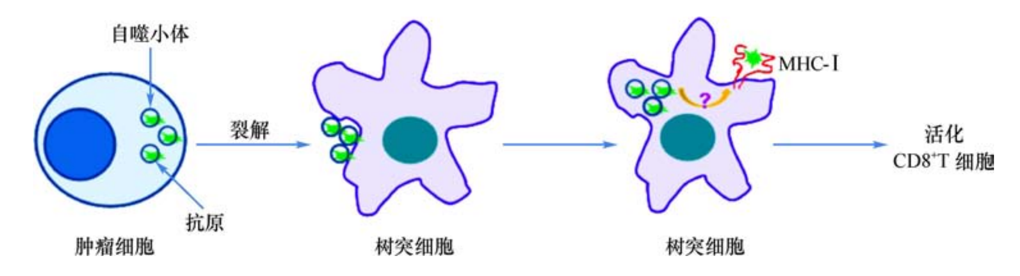


图 2　自噬在肿瘤 MHC-Ⅰ类交叉提呈中的作用

肿瘤细胞内形成包含抗原的自噬小体（autophagosome），在细胞应激或化疗后自噬小体可释放到胞外，被树突细胞（DC）摄取内吞，在 DC 内自噬小体与 MHC-Ⅰ类分子结合（结合的机制还不清楚）而被提呈到细胞表面，激活 $CD8^+$ T 细胞

还有研究认为，在对一些病毒抗原的交叉提呈中，可能抗原并不在胞浆中被降解和处理，而是完整的蛋白质被抗原提呈细胞提呈到细胞表面再被降解。

目前已有的研究只对交叉提呈的机制有了一点点认识，在很多问题上还存在着争议，要揭开交叉提呈这一谜团还有非常多的关键问题需要解决，其确切的细胞与分子机制还亟待深入了解，这可能为设计抗肿瘤、抗感染的新策略提供关键的启发。尚有许多问题等待我们去深入研究，如抗原在内体与蛋白酶体间非常规转移的分子机制及其调控因素，抗原肽及自噬小体是如何与 MHC 分子结合的，怎么来控制抗原遵循的提呈途径，内源性抗原的交叉提呈机制等。我们应结合免疫学、分子生物学、病毒学等相关学科的先进手段和方法，以及通过各学科的交叉渗透来深入研究，解决这些问题将为恶性肿瘤和感染性疾病的防治带来新的突破。

参 考 文 献

Ackerman AL, Cresswell P. 2004. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. Nat Immunol, 5(7): 678～684

Amigorena S, Savina A. 2010. Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. Curr Opin Immunol, 22(1): 109～117

Crotzer VL, Blum JS. 2009. Autophagy and its role in MHC-mediated antigen presentation. J Immunol, 182(6): 3335～3341

Kurts C, Robinson BW, Knolle PA. 2010. Cross-priming in health and disease. Nat Rev Immunol, 10(6): 403～414

Norbury CC, Basta S, Donohue KB, et al. 2004. $CD8^+$ T cell cross-priming via transfer of proteasome substrates. Science, 304(5675): 1318～1321

Schmid D, Münz C. 2007. Innate and adaptive immunity through autophagy. Immunity, 27(1): 11～21

Vyas JM, Van der Veen AG, Ploegh HL. 2008. The known unknowns of antigen processing and presentation. Nat Rev Immunol, 8(8): 607～618

撰稿人：王青青

浙江大学

HIV、流感病毒等是如何逃避免疫监控的

How Can Viruses Escape the Body's Immune Surveillance

1. 背景

有生命的地方就有病毒存在。人类进化的历史始终伴随着病毒的存在，并将继续下去。病毒感染人体可以累及呼吸道、消化道、皮肤、泌尿生殖道等多种器官和组织，是严重危害人类健康的重要病因。人类经历了约 100 年的时间，初步揭示了病毒感染特性。不过，人类对病毒感染的认识依然只是冰山一角，对自然界约 5000 种病毒的 95% 尚一无所知。病毒的变异性、病毒与宿主细胞相互作用的复杂性使得病毒难以捉摸。1979 年，WHO 宣告人类从此消灭了天花，似乎预示了人类最终战胜病毒。但各种抗病毒药在临床应用时面临的局限、艾滋病疫苗的一次次失败、SARS 带来的社会恐慌、禽流感和猪流感的全球性暴发的潜在危机再次给人类敲响了警钟，病毒这个自然界中最微小的生物，远远比我们认识的更强大、更复杂。

2. 科学意义

病毒与机体免疫系统的相互作用是一个非常复杂的过程，多年来病毒逃避宿主免疫监视的分子机制一直未明。一方面，病毒依赖宿主细胞复制系统进行自身病毒的复制和组装；另一方面，病毒利用多种方式逃避免疫系统的监控和病毒清除，完成子代病毒的不断感染、繁殖。人类免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus，HIV）、丙型肝炎病毒（hepetitis C virus，HCV）、流感病毒等能够感染人且致病，一个主要原因是它们能够逃避人体免疫系统的监视。病毒逃避机体免疫系统监视的方式是非常复杂的，探明其逃避的分子机制是研制靶向病毒阻断药物或有效疫苗的关键，是当前科学研究的热点也是难点问题。

3. 最新进展

病毒免疫逃逸（immune evasion）的概念最早由美国科学家 Bishop JM 于 1984 年提出。在随后近 30 年，科学家们对 HIV、HCV、呼吸道合胞病毒（respiratory syncytial virus，RSV）、非洲淋巴细胞瘤病毒（Epstein-Barr virus，EBV）和单纯疱疹病毒（herpes simplex virus，HSV）等进行了大量研究，初步揭示病毒逃避宿主免疫监视的一些方式，包括病毒突变、逃避 T 细胞特异识别及清除；抑制抗原提呈细胞（antigen presenting cell，APC）对病毒抗原（antigen，Ag）的加工、处理和提呈；逃避天然免疫细胞的杀伤；病毒编码蛋白参与

免疫应答负调控（图 1）；病毒抑制细胞凋亡等。其中，病毒基因变异是病毒逃避机体免疫监视的最主要机制。例如，在 HIV 感染早期患者体内有 HIV 特异细胞毒性 T 细胞（cytotoxic T lymphocyte，CTL）产生，且此高水平的 CTL 数量与血液中低浓度的 HIV 呈正相关。但随感染期延长，HIV 突变，原有 CTL 不能识别、消除 HIV 突变病毒（图 2）。同时，病毒的致病性又使机体免疫功能逐步减弱，对新出现的突变株难以产生有效的 CTL 应答，导致典型艾滋病（acquired immune deficiency syndrome，AIDS）发病，且使病情恶化。同样，HCV 所致慢性肝炎及流感的周期性大流行与病毒的基因突变均有关。

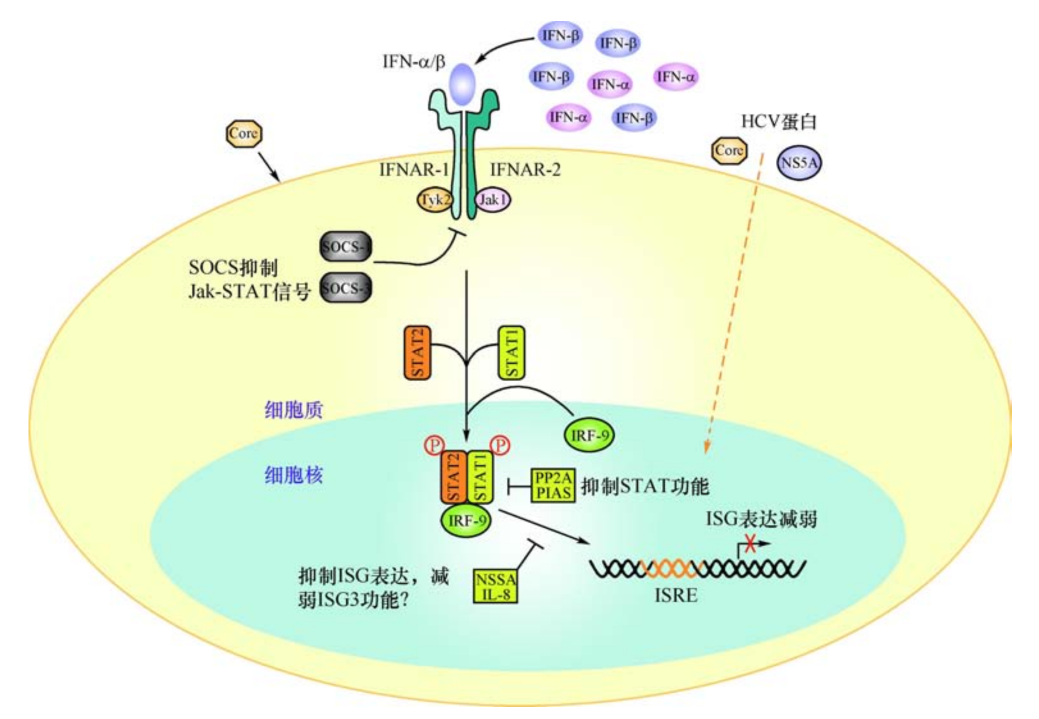


图 1　HCV 通过多种途径逃避免疫监视

SOCS. 抑制细胞因子信蛋白；Core、NS5A 均为 HCV 蛋白；IFN-α/β. Ⅰ型干扰素；STAT1、2. 信号转导激活元件；IFNAR-1、2. 干扰素-α 受体

4. 主要难点

病毒逃避免疫监视是以多种策略、全方位的形式进行的。不同病毒的免疫逃逸策略大相径庭，同一病毒则会同时利用多种策略与宿主进行较量。一方面，病毒在复制、转录过程中，点突变、插入、缺失、重叠等均易导致病毒基因突变，尤其是逆转录病毒，其逆转录酶缺乏校对功能，每次复制均可导致基因突变，这种突变的随机性和高发性使得病毒防治策略的研究面临极大挑战。大量研究表

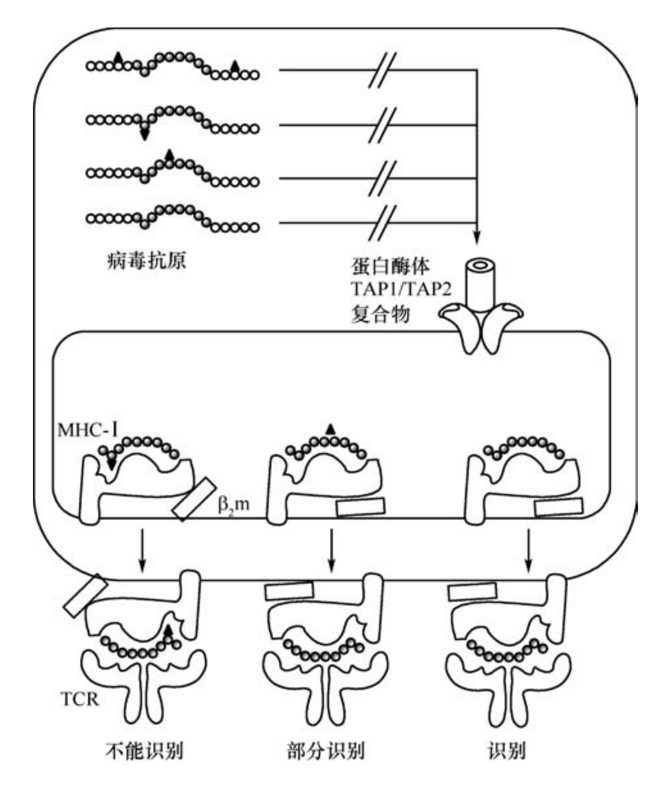


图 2　病毒抗原氨基酸序列的改变影响其加工、提呈和识别

明，在感染的早期，病毒数量还比较少，机体免疫系统能对感染的病毒产生一定的特异性免疫应答。但是，由于病毒的高度变异性，使得变异的病毒株可以逃避已形成的抗病毒免疫力，变异株病毒从劣势株逐渐成为优势株。这种高度突变性直接导致临床靶向药物治疗耐受或疫苗失效。另一方面，病毒利用、挟持宿主蛋白参与病毒复制、颠覆宿主细胞的抗病毒免疫能力，既顺利完成病毒子代的大量繁殖，同时又逃避了机体的免疫监视。一些关键的病毒蛋白、宿主蛋白及参与这些蛋白表达调控的信号通路分子或小分子 RNA 的调控或许是这场博弈的关键。如何寻找这些关键分子以逆转病毒的负调免疫应答或将是今后研究的难点和热点。

5. 展望

病毒与宿主的相互作用就是一场力量与智慧的博弈。病毒入侵机体既能诱导宿主免疫防御，又可拮抗机体免疫应答。在感染早期，少量病毒常通过免疫监视功能被消除，而不会致病，只有当机体免疫功能低下时，感染发展，病毒得以复制，才显示其明显的拮抗免疫作用。未来对抗病毒的突破口或许应在以下几个方面：首先是感染早期设计靶向药物，及时清除病毒。研究表明，在病毒感染的前

50 天，病毒突变率较低，运用靶向病毒或者其作用的宿主蛋白进行药物干预，可以有效抑制病毒复制，给机体免疫系统应答争取时间，最终依靠免疫系统的抗体或效应细胞清除病毒。其次是提高抗原提呈细胞功能。树突细胞（DC）是机体最强的抗原提呈细胞，通过前述关键分子的干预，激活、增强 DC 的提呈功能，有效激发机体免疫应答。再次，多优势表位联合疫苗设计。针对病毒高频突变的特点，选择保护性、保守区的、兼容性好的一群 T、B 细胞表位组合，既能预防疾病又能达到治疗病毒慢性感染性疾病的目的。最后，增强 NK、CTL 的功能。慢性持续性感染患者机体细胞因子失衡，通过 IL-2、IL-7、IFN-γ、IL-15 等细胞因子的合理联合应用，可有效调节 NK 和 CTL 细胞的功能状态，增强其杀伤功能。相信随着研究的深入，病毒免疫逃逸机制将浮出水面，我们也将更好地认识病毒，制定理想的病毒性疾病治疗方案。

参考文献

Alexaki A ,Liu Y ,Wigdahl B. 2008. Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence. Curr HIV Res ,6(5):388～400

Gale M Jr ,Foy EM. 2005. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. Nature ,436 (7053): 939～945

Goulder PJ ,Watkins DI. 2004. HIV and SIV CTL escape: implications for vaccine design. Nat Rev Immunol ,4(8): 630～640

Haase AT. 2010. Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission. Nature ,464 (7286): 217～223

Koup RA. 1994. Virus escape from CTL recognition. J Exp Med ,180(3): 779～782

Leslie AJ , Pfafferott KJ , Chetty P ,et al. 2004. HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. Nat Med ,10(3):282～289

Rehermann B. 2009. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses : a tale of coevolution and coexistence. J Clin Invest ,119(7): 174517～174554

Tahirov TH ,Babayeva ND , Varzavand K ,et al. 2010. Crystal structure of HIV-1 Tat complexed with human P-TEFb. Nature ,465(7299): 747～751

Yokosuka T ,Saito T. 2010. The immunological synapse , TCR microclusters , and T cell activation. Curr Top Microbiol Immunol ,340 :81～107

撰稿人：李晋涛
第三军医大学

为何研制 HIV 等疫苗迄今难以成功

The Barriers of HIV Vaccine Development

1. 背景

人类免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus，HIV）是引起获得性免疫缺陷综合征（acquired immune deficiency syndrome，AIDS；也称艾滋病）的一种 RNA 病毒。它主要攻击人体免疫系统 $CD4^{+}$ T 细胞，逐渐导致人体免疫系统崩溃，使其失去抵抗病原微生物感染及监视肿瘤发生的功能，进而使人体发生机会性感染及恶性肿瘤等临床综合征。第十八届国际艾滋病会议发表报告指出，目前全球约有 3340 万人感染 HIV，以非洲国家 HIV 感染人数最多，全球 HIV 感染人数正在急剧增加。因此，控制 HIV 传播与感染是 21 世纪医学界面临的一大难题。

2. 科学意义

HIV 被发现已将近 30 年，虽然高效抗逆转录病毒的治疗方法（highly active antiretroviral therapy，HAART）已经在减轻患者痛苦、延长患者寿命等方面取得了一定的效果，但用于治疗 HIV 感染的药物只能控制病毒复制，不能彻底清除病毒，而且抗 HIV 药物价格昂贵，具有较严重的副作用，如药物使用不当，也会诱发耐药株的产生。研制有效、安全、廉价的疫苗一直被认为是控制和预防 HIV 感染最有效的措施，但至今仍没有一种理想的疫苗能够预防和治疗艾滋病。HIV 感染人数的不断增加、疫情由高危人群向普通人群的扩散及抗 HIV 药物耐药性的增加都迫使人们不得不加快 HIV 疫苗研制的步伐。大批的优秀科学家和大量的经费都投入到了 HIV 疫苗的研制上来，HIV 疫苗的研制已经成为一项全球性的亟待解决的科学难题。

3. 最新进展

HIV 被发现后人们就开始了 HIV 疫苗的研制。20 世纪 80 年代，诱导 HIV 中和抗体是疫苗研制的主要方向，以膜蛋白亚单位疫苗（gp120）或合成肽疫苗为代表。由 VaxGen 公司开发的疫苗 AIDSVax，是 HIV 外膜糖蛋白 gp120 的重组体，是唯一已进入人体Ⅲ期临床试验的 HIV-1 疫苗。虽然采用了乙肝疫苗的成功经验，但是在志愿者中进行的试验表明，该疫苗不能预防感染的发生，显然 AIDSVax 不能诱导产生广谱的中和抗体。HIV 的高突变性、膜蛋白的不稳定性及高度保守的 HIV 中和抗体无法接近病毒等原因都使这一类型疫苗的研制最终

以失败而告终。但是在HIV感染的个体体内检测到高效价的HIV抗体又证明了这一策略的可行性。最近在技术上的突破例如结构生物学、低温电子成像、计算生物学等可能会克服诱导高效价HIV抗体的技术屏障。20世纪90年代，对HIV生活史的研究使人们发现细胞免疫可以将HIV病毒载量控制到低水平甚至检测不到。于是诱导细胞毒性T细胞（cytotoxic T lymphocyte，CTL）成了疫苗研制的主要方向，以DNA疫苗和重组载体疫苗为代表。Merck公司的MRK-Ad5HIV-1（Gag、Pol、Nef）三价疫苗在进行了两项临床试验后发现该三价疫苗不能预防HIV感染，也不能降低接种疫苗的志愿者感染HIV后的病毒水平，所以两项研究均不得不提前中止。第一个CTL疫苗的研制失败使人们不得不寻找新的方向。

目前人们尝试着研究的疫苗主要包括DNA疫苗、活载体疫苗、多价蛋白疫苗等，强调各类疫苗联合免疫，更加注重对天然HIV抗原的改造和使用复制型载体提呈HIV抗原以期诱导针对不同亚型病毒保守表位更强的体液和细胞免疫应答。在泰国进行的一项使用金丝雀痘病毒艾滋病疫苗（ALVAC，一种可以表达gp120、Gag和Pol的病毒载体）和AIDSVax疫苗的联合免疫方案被证明有一定的保护作用，疫苗接种者比对照组感染HIV-1者减少了30%，是目前唯一一次被证实有一定效果的临床试验（表1）。

表1　目前进行的三次HIV疫苗临床试验

疫苗名称	疫苗设计策略	临床试验结果
AIDSVax	诱导HIV-1外膜糖蛋白gp120中和抗体	无保护作用
MRKAd5HIV-1	诱导$CD8^+$ T细胞反应	无保护作用
ALVAC&AIDSVax	通过联合免疫方案既诱导产生gp120抗体，同时产生$CD8^+$ T细胞应答	有一定的保护作用，但是是抗体、T细胞还是天然免疫细胞发挥作用，或者是三者联合作用目前仍不清楚

4. 主要难点

一种理想的疫苗应该既能产生广谱的中和抗体，又能诱导CTL应答。但是由于HIV感染宿主和病毒与免疫系统之间的相互作用还不清楚，CTL清除病毒的机制尚未阐明，以及HIV的高度变异性，使得HIV疫苗的研制受到了极大的制约。此外，有研究认为只有当gp120与CD4结合后才能够由于分子构象的变化暴露出辅助受体的结合位点，而gp120和CD4结合会在空间上阻止抗体与辅助受体的结合。即使有抗体可以与这些辅助受体结合，病毒也可能会改变几个氨基酸残基进而发挥HIV的免疫逃逸机制。最近研究表明，HIV颗粒表面糖基化非常特异，疫苗的糖基化与天然病毒蛋白糖基化不同，所以激发产生的抗体不能

与 HIV 有效结合。同时，又有研究表明 HIV 可以通过树突细胞（DC）感染，DC 与 T 细胞通过相互接触形成突触将病毒从 DC 传递给 $CD4^+$ T 细胞，从而逃避了抗体的中和作用。因此，寻找合适的毒株，对 HIV 传播、感染及致病机制的研究，HIV 感染模型的建立及创新的疫苗研制策略都会为疫苗研制寻求突破点。

5. 展望

全球 HIV 感染和 AIDS 日趋严重，HIV 疫苗的研制也日益受到人们的重视，并取得了一些可喜的进展。如今在 HIV 疫苗研制中比较现实的目标是制备出的疫苗能在初始感染时降低其感染水平，并在以后能有效控制病毒复制水平，以减缓临床病程进展。随着对 HIV 研究的深入，HIV 的流行特点、流行株的克隆、测序和重配等基础工作的完成，以及 HIV 病毒本身生物学特性尤其是基因变异情况的阐明，将不断开发出新的更有效的疫苗，最终实现预防和治疗 AIDS 的愿望。

参考文献

Abdel-Motal UM, Wang S, Awad A, et al. 2009. Increased immunogenicity of HIV-1 p24 and gp120 following immunization with gp120/p24 fusion protein vaccine expressing alpha-gal epitopes. Vaccine, 28(7): 1758～1765

Barouch DH, Korber B. 2010. HIV-1 vaccine development after STEP. Annu Rev Med, 61: 153～167

Goldstein G, Chicca JJ. 2009. A universal anti-HIV-1 Tat epitope vaccine that is fully synthetic and self-adjuvanting. Vaccine, 28(4): 1008～1014

Koff WC. 2010. Accelerating HIV vaccine development. Nature, 464(7286): 161～162

McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, et al. 2009. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. Nat Rev Immunol, 10(1): 11～23

Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, et al. 2009. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. N Engl J Med, 361(23): 2209～2220

Vasan S, Schlesinger SJ, Chen Z, et al. 2010. Phase 1 safety and immunogenicity evaluation of ADMVA, a multigenic, modified vaccinia Ankara-HIV-1 B'/C candidate vaccine. PLoS One, 5(1): e8816

撰稿人：李晋涛
第三军医大学

免疫耐受形成的机制及研究价值

Mechanisms of Immune Tolerance and It's Significance

免疫系统最重要的功能是识别抗原并对抗原物质产生免疫应答，但机体的免疫系统在一定条件下接触某种抗原后会出现低应答或无应答状态，而对其他的抗原仍表现出正常的免疫应答，此现象称为免疫耐受（immune tolerance）。早在1938 年人类就观察到了免疫耐受的现象，Owen 首先报道了在胚胎期接触同种异型抗原所产生的天然免疫耐受现象。Burnet 推测此种免疫耐受的形成与免疫系统在发育的早期接触抗原导致反应性淋巴细胞缺失或失活有关。1954 年，Bilingham、Brent、Medawar 等证明可以通过人工诱导产生对“非己”抗原的耐受。据此，Burnet 于 1957 年提出了免疫耐受的克隆选择学说（clonal selection theory）。1959 年，Ledergerg 提出了克隆流产学说，进一步完善了克隆选择学说。此后，尽管又出现了多种解释免疫耐受机制的相关学说，但迄今为止，免疫耐受产生的机制仍未完全清楚。免疫耐受的机制可以说是免疫学发展历史上一个一直没有得到解决的关键而重要的科学难题。

对于免疫耐受机制的深入认识，具有十分重要的科学意义。免疫耐受的作用与机体的正免疫应答相反，但两者均是免疫系统功能的重要组成部分，免疫耐受是机体对抗原的一种特殊的免疫应答状态。对自身抗原的耐受可以避免自身免疫性疾病的发生，而对外来病原体抗原或突变细胞的耐受，则可能导致严重的感染或发生肿瘤。因此，免疫耐受产生的机制本身是一个重要的理论问题。对于免疫耐受产生机制的认识，不仅有助于认识机体正常的生理功能，以及多种免疫相关性疾病包括自身免疫性疾病、肿瘤、感染、移植排斥反应的发病机制，还具有极为重要的应用价值，即如何通过打破免疫耐受或诱导建立免疫耐受治疗上述免疫相关性疾病，为这些疾病的治疗提供了新的更为有效的途径。而如何建立打破及诱导免疫耐受的方法也是免疫学领域重要的科学难题。

尽管目前对于免疫耐受的机制仍不十分清楚，该方面研究在最近几十年还是不断取得进展，对于免疫耐受机制的认识在不断加深。目前认为，中枢耐受和外周耐受的机制不完全相同，例如中枢耐受的机制包括克隆清除、克隆禁忌、克隆流产、克隆失能等，而外周耐受机制包括克隆忽略、克隆失能、克隆清除、信号转导障碍、免疫隔离、抑制性调节等。研究者们提出这么多的机制和学说也表

明，免疫耐受是一个较为复杂的免疫现象，这些机制中尚没有能被广为接受、能完全解释免疫耐受的发生。近年来该方面研究中突破性的进展不多，最重要的进展是发现一些免疫细胞、免疫分子（包括一些信号分子）在免疫耐受中的作用。与免疫耐受的产生关系最密切的细胞包括树突细胞和调节性 T 细胞等。免疫耐受的诱导离不开抗原提呈细胞，树突细胞是机体内最重要的抗原提呈细胞，无论是在中枢耐受还是在外周耐受产生的过程中均发挥着十分重要的作用。例如在胸腺中，树突细胞就参与了对 T 细胞的阴性选择；而在外周耐受中，树突细胞的成熟状态也决定了其提呈抗原时是诱导免疫应答还是免疫耐受，成熟的树突细胞诱导的是免疫应答，而未成熟树突细胞则易于诱导免疫耐受。另一类重要的免疫细胞是调节性 T 细胞，目前的研究表明，调节性 T 细胞在免疫耐受的发生过程中发挥着极为重要的作用。该类细胞能通过细胞之间的直接接触和抑制性细胞因子等抑制自身免疫 T 细胞的活化，维持自身免疫耐受，防止自身免疫病的发生。此类细胞还在其他多种免疫耐受相关的生理和病理过程中发挥着重要作用，例如母胎免疫、肿瘤免疫等。除了一些参与免疫耐受的免疫细胞亚群外，一些重要的免疫分子特别是一些具有抑制性功能的免疫分子在免疫耐受中的作用也引起了广泛的重视，如 CTLA-4 等。近年来针对这些细胞和分子所开展的研究不仅为认识免疫耐受的机制提供了理论基础，也为多种疾病的治疗提供了新的思路。树突细胞、调节性 T 细胞及多种免疫抑制性分子均成为疾病免疫治疗的靶细胞和靶分子。而针对免疫耐受的机制，通过建立免疫耐受或打破免疫耐受治疗疾病也成为目前疾病免疫治疗研究的新热点。如通过治疗性疫苗打破机体对乙型肝炎病毒抗原的免疫耐受，达到治疗乙型肝炎的目的，是目前国内外很多实验室正在研发的项目。而通过建立免疫耐受治疗移植排斥反应，也被认为是器官移植领域最有希望的治疗方式之一。

一百多年来，人类对于免疫激活的研究远远多于免疫耐受，因而对免疫激活机制的认识远较免疫耐受深入。一方面原因是早期研究均试图解释正免疫应答的机制而对于负免疫应答关注不够；另一方面原因是免疫耐受机制研究难度较大。目前的难点在于哪些重要的免疫细胞、免疫分子在免疫耐受过程中发挥作用，如何发挥作用。而在建立和打破免疫耐受方法的研究方面，如何有效诱导免疫耐受一直是免疫学领域的难题，而打破免疫耐受却不造成免疫损伤可能是该方面研究需要关注的问题。

总之，对免疫耐受机制的认识具有重大理论和应用价值。免疫耐受与临床医学密切相关，建立耐受，可使移植物存活；恢复对自身抗原耐受，可治疗自身免疫病。反之，打破免疫耐受，恢复免疫应答，在抗感染、抗肿瘤免疫中具有重要作用。

参考文献

Pan PY, Ozao J, Zhou Z, et al. 2008. Advancements in immune tolerance. Adv Drug Deliv Rev, 60(2):91～105

Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, et al. 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. Cell, 133(5):775～787

Steinman RM. 2003. The control of immunity and tolerance by dendritic cell. Pathol Biol (Paris), 51(2):59～60

撰稿人：于益芝
第二军医大学

免疫细胞发育分化调控机制研究

Study about the Generation of Immune Cells and the Underlying Mechanism

免疫系统（immune system）是生物体内一个能辨识出“非我成分”（通常是外来的病菌）、运用不同机制将之消灭或排除的整体结构的统称。它能从“自身”的细胞或组织辨识出“非我成分”。免疫系统具有防御、监视、消除外来异体物质（抗原）和监视、清除身体内衰老细胞及突变细胞的生理作用，在体内实现免疫防御、免疫监视和免疫稳定三方面的功能。免疫系统的任何结构改变和功能失调，将使体内识别异物和清除异物的自身免疫抗病能力降低，引起各种感染性疾病、自身免疫性疾病或肿瘤。构成免疫系统的核心成分是淋巴细胞，免疫细胞即能识别抗原、产生特异性免疫应答的淋巴细胞，是免疫系统发挥作用的基础。免疫细胞是由造血干细胞（hemopoietic stem cell）分化发育而来，造血干细胞又称多能干细胞，是存在于造血组织中的一群原始造血细胞。造血干细胞定向分化、增殖为不同的血细胞系，并进一步生成血细胞及免疫细胞。造血干细胞具有多潜能性，即具有自身复制和分化两种功能。在胚胎和迅速再生的骨髓中，造血干细胞多处于增殖周期之中；而在正常骨髓中，则多数处于静止期（G_0期），当机体需要时，其中一部分分化成熟，另一部分进行分化增殖，以维持造血干细胞的数量相对稳定。造血干细胞进一步分化发育成不同血细胞系的定向干细胞。定向干细胞多数处于增殖周期之中，并进一步分化为各系统的血细胞系，如红细胞系、粒细胞系、单核/巨噬细胞系、巨核细胞系及淋巴细胞系。如机体内造血干细胞缺陷，则可引起严重的免疫缺陷病。因此，免疫细胞的分化发育途径及调控机制研究是免疫学基础研究的重点和热点之一。

从造血干细胞到免疫细胞的分化发育受多种因素的共同调控，以确保机体在不同发育阶段和不同的生理及病理条件下拥有与机体功能相适应的免疫细胞群体，并通过免疫细胞不同群体之间精细的比例、数量和功能调控，确保完成相应的免疫功能。其中所涉及的调控元件包括基质微环境、细胞因子、转录因子和microRNA 等：①基质细胞是指构成微环境的具有支持和营养功能的细胞群的总称，主要有上皮细胞、内皮细胞、巨噬细胞、脂肪细胞等，也不排除有专职的基质细胞类型。不同的造血器官和免疫器官其功能和细胞组成有很大不同，主要与本身的微环境有关。例如，骨髓是多种造血和免疫细胞分化发育的场所，胸腺是

T 细胞特异的分化发育场所。因此，从某种意义上讲，不同的基质微环境决定了造血干细胞静息、自我更新或分化等不同的状态以及不同的分化发育途径。②造血干细胞是非常原始的全能造血细胞，其定向分化、增殖及存活受到多种因子的调控。细胞因子能够通过促使干细胞入血、净化干细胞收集物、发挥移植物抗肿瘤效应、促进造血干细胞移植后免疫重建、减少移植物抗宿主疾病等并发症、促进干细胞扩增、调控骨髓造血微环境等，直接或间接参与造血干细胞移植的调节。目前已鉴定的能作用于造血干细胞的刺激及抑制因子中正向调控因子主要有白细胞介素（IL）、干细胞因子（SCF）、红细胞生成素（EPO）、集落刺激因子（CSF）等，而负向调控因子有转化生长因子-β（TGF-β）、肿瘤坏死因子-α/β（TNF-α/β）、四肽 AcSDKP 和五肽 pEEPCK 等。③转录因子能打开或关闭基因，而造血干细胞本身就是拥有高度活跃基因的组合体，转录因子在造血干细胞自我更新和分化中发挥重要作用。Wnt 信号途径、Notch 信号途径、同源盒（HOX）转录因子家族等可以调控 HSC 的自我更新能力；Ets 转录家族成员参与 B 细胞发生过程调控，PU.1 通过调控祖细胞活素依赖性的增殖与分化来调节淋巴系和髓系细胞发育、骨髓祖 B 细胞分化阶段。Pax5 高表达促进 B 细胞发育、抑制 T 细胞发育等。④microRNA 是一类长约 22nt 的小分子非编码 RNA，具有高度的种间保守性和时空特异性，在转录后水平调节靶基因的表达，是细胞内基因表达的基本调控机制之一。最近的研究表明，microRNA 在干细胞的自我更新和分化过程中具有重要的调控作用。尽管目前已知基质微环境、细胞因子、转录因子和 microRNA 在造血干细胞分化发育中发挥重要作用，而且相关研究已发现部分作用机制，然而这四个方面的详细作用机制是什么？这四个方面相互之间是否有相关性？其具体调控机制是什么？这些作用机制与多种疾病之间是否有相关性？这种相关性研究结果怎样应用于临床诊断和临床治疗？这些都是该领域研究的重点和主要难点。

免疫细胞发育分化方面的研究不仅为免疫学基础理论研究奠定了基础，而且具有重要的临床诊断和治疗意义。一方面，免疫细胞发育分化异常通常是许多免疫相关疾病的遗传学基础，诸如胸腺发育不全，导致 T、B 细胞不足，引起 DiGeorge 综合征；SH2D1A 突变，导致 B 细胞生长失控，引起性联淋巴细胞增殖性综合征等。另一方面，造血干细胞移植和功能性免疫细胞体内回输性细胞治疗是临床上血液性疾病、实体肿瘤、自身免疫性疾病及遗传性疾病等多种疾患最有效的治疗手段或辅助治疗手段。然而，目前免疫细胞发育分化的相关研究大多处于起步阶段，免疫细胞发育分化阶段的划分相对粗糙，无法明确鉴定标志；免疫细胞发育分化的具体调控因素目前已知的只是冰山一角；调控因素之间存在着网络化的精确调控体系，对此我们尚不清楚。以上这些问题都是该领域亟待研究的重大科学问题，不管是对基础理论研究还是对临床实践应用都具有划时代的意义。

参 考 文 献

Chute JP, Ross JR, McDonnell DP. 2010. Minireview: nuclear receptors, hematopoiesis, and stem cells. Mol Endocrinol, 24(1): 1～10

Crowther M, Avenell A, Culligan DJ. 2009. Systematic review and meta-analyses of studies of glutamine supplementation in haematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant, 44(7): 413～425

Dekoter RP, Singh H. 2000. Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded exp ression of PU. 1. Science, 288: 1439～1441

Eliasson P, Jönsson JI. 2010. The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. J Cell Physiol, 222(1): 17～22

Hatfield SD, Shcherbata HR, Fischer KA, et al. 2005. Stem cell division is regulated by the microRNA pathway. Nature, 435: 974～978

Moore KA. 2004. Recent advances in defining the hematopoietic stem cell niche. Curr Opin Hematol, 11(2): 107～111

Pelus LM. 2008. Peripheral blood stem cell mobilization: new regimens, new cells, where do we stand. Curr Opin Hematol, 15(4): 285～292

Radtke F, Wilson A, Mancini SJ, et al. 2004. Notch regulation of lymphocyte development and function. Nat Immunol, 5 (3): 247～253

Reya T, Duncan AW, Ailles L, et al. 2003. A role for Wnt signaling in self-renewal of haematopoietic stem cells. Nature, 423: 409～414

Reya T. 2003. Regulation of hematopoietic stem cell self-renewal. Recent Prog HOITn Res, 58: 283～295

Risitano AM, Maciejewski JP, Selleri C, et al. 2007. Function and malfunction of hematopoietic stem cells in primary bone marrow failure syndromes. Curr Stem Cell Res Ther, 2(1): 39～52

Sigvardsson M. 2009. New light on the biology and developmental potential of haematopoietic stem cells and progenitor cells. J Intern Med, 266(4): 311～324

Sitnicka E. 2009. From the bone marrow to the thymus: the road map of early stages of T-cell development. Crit Rev Immunol, 29(6): 487～530

撰稿人：韩岩梅
第二军医大学

免疫细胞如何感知危险信号

How Do Immune Cells Sense Dangerous Signals

环境中存在着多种多样的病原微生物，入侵哺乳类动物机体后会导致感染性疾病的发生，威胁着哺乳类动物的健康。在多数情况下，一旦发生病原微生物感染，哺乳类动物的免疫细胞就会立即发现这些入侵的外来微生物，分泌促炎症细胞因子等活性介质，启动固有免疫反应的发生，限制病原微生物在体内的繁殖并最终清除入侵的病原微生物。免疫细胞如何即时地发现入侵的病原微生物呢?

阐明这一问题不仅有助于人们了解免疫反应发生的机制，而且可以为感染性疾病、炎症与自身免疫性疾病及肿瘤等多种疾病的治疗提供新的思路。

尽管人们早就意识到，免疫系统可能会表达某些成分，通过结合病原成分启动固有免疫反应。但直到 20 世纪 90 年代，美国耶鲁大学 Janeway 实验室和德州大学西南医学中心 Beutler 实验室发现 Toll 样受体介导免疫细胞对细菌内毒素的识别，才开始了解免疫细胞发现入侵的病原微生物并立即启动固有免疫反应的分子机制。

内毒素或称脂多糖，是革兰阴性菌的细胞壁成分。用内毒素刺激巨噬细胞等固有免疫细胞，在数十秒内即可观察到免疫细胞内钙离子流动，数分钟内可以检测到有丝分裂原激活的蛋白激酶等信号转导分子的磷酸化，数十分钟内可以检测到炎症细胞因子以及Ⅰ型干扰素基因的表达，显示内毒素的刺激可以迅速引起免疫细胞内的信号转导。换而言之，巨噬细胞等固有免疫细胞可以迅速发现细胞外环境中革兰阴性菌来源的内毒素的存在，并在很短的时间内通过细胞内信号转导过程启动固有免疫反应的发生。

人们很久以前就开始猜测，免疫细胞膜表面可能表达某些特殊的蛋白分子，可以结合内毒素并向细胞内传递活化信号，介导炎症反应的发生，并一直致力于内毒素受体的发现。1997 年，Medzhitov 和 Janeway 首次在人类细胞中克隆了编码与果蝇相似的 Toll 蛋白基因，发现人 Toll 蛋白的活化可诱导炎症细胞因子的表达。此后，这种蛋白分子被称为 Toll 样受体（TLR）。1998 年，Beutler 证明对内毒素耐受、对革兰阴性菌易感的 C3H/HeJ 和 C57BL/10ScCr 小鼠 TLR4 基因发生了突变，确立了 TLR 对内毒素的识别在抗感染免疫中的作用。此后，在哺乳类动物免疫细胞中已经发现十多种 TLR 分子，识别病原来源的多种保守成分。有趣的是，这些 TLR 具有相似的信号转导结构域，但却针对不同种类的病

原介导免疫细胞产生不同类别、数量的细胞因子。这些分子为什么可以产生相互区别的信号效应目前还是未解之谜。

TLR 所识别的对象大多是病原表达的保守成分，被称为“病原相关分子模式”；而免疫细胞中识别这些病原保守成分并活化免疫细胞、启动固有免疫反应的分子被称为“病原相关模式识别受体”。目前已发现的模式识别受体主要包括 TLR、RLR、NLR、lectin 结合蛋白及一些 DNA 结合蛋白，仅有 20 个左右。由于它们所识别的对象往往是某种或多种微生物所共有的组成成分，这些模式识别受体虽然种类有限，但却可以介导免疫细胞识别多种多样的病原微生物。除了已知的模式识别受体，免疫细胞中是否还表达更多的模式识别受体还有待进一步研究。

病原相关分子模式能够被免疫细胞所识别，从而启动固有免疫反应。除了病原相关分子模式在结构上有别于哺乳类动物所表达的内源性分子，还在于病原成分在宿主细胞内的分布有别于哺乳类动物所表达的内源性分子。例如，细菌 DNA 中存在着 CpG 基序，哺乳类动物的 DNA 中没有这种结构，可以被 TLR9 所识别。另一方面，宿主 DNA 在正常情况下位于胞核或线粒体内，而胞内细菌或病毒在增殖与复制的过程中，会将 DNA 物质释放到宿主细胞质中，与细胞质中的 DNA 模式识别分子结合，触发固有免疫反应。同样，细胞质中病原来源的双链 RNA 也会与宿主细胞质中的双链 RNA 模式识别分子结合，触发固有免疫反应。胞浆中有哪些 DNA、RNA 结合蛋白具有模式识别受体的功能，是目前模式识别研究领域的热点之一。

不仅病原微生物感染会活化免疫细胞产生细胞因子，组织损伤、细胞衰老、肿瘤发生等也会活化免疫细胞产生细胞因子。Matzinger 把病原感染、组织损伤等过程中产生的、可能引起免疫反应的内源性、外源性分子统称为“危险相关分子模式”，拓展了“模式识别”的内涵。事实上，TLR4 等模式识别受体不仅能识别内毒素等病原成分，也能识别一些内源性配体，如热休克蛋白等。这些内源性配体的产生大多是由于机体处于感染、组织损伤或其他应激状态。如果 Matzinger 的“危险模式”理论成立，有哪些危险信号可以触发免疫反应？有哪些“危险相关模式识别受体”负责识别这些“危险信号”、其相互识别结构基础是什么呢？由于体内可能出现的“危险信号”多种多样，未知的“危险相关模式识别受体”可能还有很多，而它们在分子结构上又具有明显的差异，回答这一问题还需要更多深入、细致的研究。

参 考 文 献

Chiu YH, Macmillan JB, Chen ZJ. 2009. RNA polymerase Ⅲ detects cytosolic DNA and induces type Ⅰ interferons through the RIG-Ⅰ pathway. Cell, 138: 576～591

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature, 408: 740～745

Matzinger P. 2002. The danger model: a renewed sense of self. Science, 296: 301～305

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. 1997. A human homologue of the drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature, 388: 394～397

Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. Science, 282: 2085～2088

撰稿人：安华章
第二军医大学

免疫细胞是如何迁移的

The Mechanism of Immune Cells Migration

1. 背景

细胞迁移（cell migration）是指细胞在接收到迁移信号或感受到某些物质的浓度梯度后而产生的移动。免疫细胞（immune cell）泛指所有参与免疫应答或与免疫应答有关的细胞及其前体，主要包括 T/B 细胞、巨噬细胞、树突细胞（dendritic cell，DC）、NK 细胞及粒细胞。免疫细胞迁移，即为免疫细胞在感受到迁移指令后而产生的移动。除了免疫细胞，其他细胞如血管内皮细胞、成纤维细胞及肿瘤细胞等均可进行迁移。肿瘤细胞的定向迁移是肿瘤转移的基础，也是目前肿瘤难以治愈的关键所在。本文主要探讨免疫细胞是如何感知迁移信号及迁移信号又如何指导细胞“正确”到达指定位置。

2. 科学意义

首先，无论是先天性免疫还是获得性免疫都离不开免疫细胞的有效迁移。如局部发生感染时，大量的免疫细胞包括 DC、单核/巨噬细胞、粒细胞、NK 细胞等从居住组织、血液等迅速集结到感染部位。其中粒细胞和 NK 细胞或通过释放活性物质或直接杀伤感染的细胞发挥先天抗感染免疫，而 DC 摄取抗原后，需要进一步迁移到脾脏和淋巴结，被定居此处的抗原特异性的淋巴细胞识别后使之活化并增殖，而后这些抗原特异性的淋巴细胞再迁出脾脏和淋巴结到达感染部位，发挥获得性抗感染免疫。其次，免疫细胞的分化、发育及成熟过程均依赖于细胞的有效迁移。如胸腺发育的 T 细胞及骨髓发育的 B 细胞，均需进入血流进行迁移。此外，病理情况下免疫细胞迁移是其发挥效应的重要保证。如外伤、移植排斥、自身免疫病甚至肿瘤等免疫相关性疾病的发生和发展过程中均涉及免疫细胞的迁移。免疫细胞迁移是目前免疫学研究的一个热门方向，科学家们试图通过对免疫细胞迁移的研究，在控制炎症和感染、降低移植排斥及自身免疫病的发生和发展、阻止癌症转移等方面取得更大进展。因此，免疫细胞迁移及其相关机制的揭示具有重大的科学意义和应用价值。

3. 最新进展

免疫细胞如何感知迁移信号及迁移信号如何指导细胞“正确”迁移，到目前为止虽然有了一定的认识，但对整个过程的了解尚未透彻。细胞迁移是个复杂的过程，其中涉及多种信号分子的相互识别和相互作用。总结起来，细胞迁移需要

外因和内因两方面的共同作用。外因是指引导或诱导免疫细胞迁移的相关信号；内因是指免疫细胞接受到迁移信号后其表面的相关分子通过识别迁移信号后启动胞内相关信号程序，从而指导细胞的定向运动。研究发现，诱导免疫细胞迁移的相关信号分子的种类很多，包括细菌或病毒的代谢产物、细胞因子和趋化因子等，其中研究得最为深入的是趋化因子。

4. 主要难点

趋化因子及其受体介导的免疫细胞迁移机制的主要难点包括以下几个方面：第一，趋化因子及其受体种类繁多，且并非一一对应关系。一种趋化因子对应多种趋化因子受体，一种趋化因子受体也对应多种趋化因子，而且新的趋化因子及趋化因子受体不断被发现。第二，不同免疫细胞或同一免疫细胞在不同的刺激下也表达不同的趋化因子受体或分泌不同类型的趋化因子，从而募集不同类型的免疫细胞，因而在不同类型的疾病中具有不同的功能。例如肝损伤导致大量的趋化因子释放，其中 MCP-1（CCL2）通过其受体 CCR2 募集大量单核细胞，而 RANTES（CCL5）通过受体 CCR1 和 CCR5 分别募集 NK 和 T 细胞。第三，趋化因子及受体介导的细胞迁移通常是“逆浓度梯度”的。如细菌感染时，感染部位释放大量的趋化因子，该区域趋化因子含量最高，扩散后在相关区域呈浓度递减梯度分布，血液或组织中分布的表达相应趋化因子受体的免疫细胞接收到迁移信号后，呈“逆浓度梯度”到达感染部位。其中不同的刺激因素，如感染、外伤、移植排斥、自身免疫病及肿瘤等发生发展过程中分泌哪些种类的趋化因子，这些因子之间是相互协同还是拮抗的关系，哪些免疫细胞能够被趋化，以及免疫细胞之间如何相互作用等仍然需要进一步细化研究。第四，细胞在移行过程中是如何确定前进方向的？细胞在移行的每一个阶段都要相应的蛋白质在适当的位置被激活，而且这一连串的蛋白质活化不是同时平行进行，而是先后有序地被激活。因此，免疫细胞接收到迁移信号后如何序贯激活不同的蛋白质，哪些信号及蛋白质参与了该过程，以及该过程受到哪些分子的精密调控才使得免疫细胞有效定向迁移均是研究的难点和热点。

5. 展望

虽然对免疫细胞是如何快速、有效迁移机制的研究尚存在诸多的难点，但近年来免疫细胞迁移相关技术的发展为免疫细胞迁移的深入研究提供了技术平台。目前通常采用将靶蛋白的编码基因进行突变，或者应用 RNA 干扰技术，或者加入靶蛋白的阻断剂抑制蛋白质的功能，进而分析该处理对细胞迁移的影响来研究某一蛋白质在细胞迁移中的作用。3D 及 4D 成像技术和时间延迟成像显微镜（time-lapse video microscopy）技术目前在免疫细胞迁移研究中也得到了广泛应用。此外，电子细胞基质阻抗判断技术（electric cell-substrate impedance sensing，ECIS）及荧光协助转移侵入和运动分析法（fluorescence-assisted transmi-

gration invasion and motility assay，ATIM）也越来越多地应用到该领域。相信随着研究的深入和技术的进一步完善，免疫细胞迁移中的很多难题都会逐渐得到解决，将在炎症和感染的控制、降低移植排斥及自身免疫病的发生发展、阻止癌症转移等领域造福人类。

参考文献

Beltman JB，Marée AF，de Boer RJ. 2009. Analysing immune cell migration. Nat Rev Immunol，9(11)：789～798

Colvin BL，Matta BM，Thomson AW. 2008. Dendritic cells and chemokine-directed migration in transplantation：where are we headed. Clin Lab Med，28(3)：375～384

Karlmark KR，Wasmuth HE，Trautwein C，et al. 2008. Chemokine-directed immune cell infiltration in acute and chronic liver disease. Expert Rev Gastroenterol Hepatol，2(2)：233～242

Masataka K，Christopher VC. 2010. New observations on the trafficking and diapedesis of monocytes. Current Opinion in Hematology，17：43～52

Nitschke C，Garin A，Kosco-Vilbois M，et al. 2008. 3D and 4D imaging of immune cells in vitro and in vivo. Histochem Cell Biol，130(6)：1053～1062

Raju CR，Theodore JS. 2010. Effects of sepsis on neutrophil chemotaxis. Current Opinion in Hematology，17：18～24

Tybulewicz VL，Henderson RB. 2009. Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. Nat Rev Immunol，9(9)：630～644

Wöllert T，Langford GM. 2009. High resolution multimode light microscopy of cell migration：long-term imaging and analysis. Methods Mol Biol，586：3～521

撰稿人：刘秋燕

第二军医大学

妊娠过程中母体免疫系统是如何“耐受”胎儿的

How Mother’s Immune System Is Tolerated to Fetus in Gestation Progress

1. 背景

妊娠过程中的母-胎关系是一种独特的免疫学现象，成功的妊娠需要母体免疫系统能耐受携带父系抗原的同种半异体胎儿。母体是如何建立对胎儿耐受的？这一问题至今仍令免疫学家迷惑并为之着迷，也是当前免疫学领域未解决的重要科学问题之一。妊娠时母胎界面出现大量免疫细胞浸润，胚泡似处在免疫细胞与细胞因子/趋化因子组成的“海洋”中，标志着母体免疫系统是处在“激活”状态。然而，母体对“异体”（胎儿）的应答却有悖于经典的移植免疫学理论，不对胎儿发生排斥反应。1953 年，梅达沃（Medawar）首次提出妊娠母胎耐受的概念并提出了三种解释机制，其核心内容是局部“屏障”结构和母体免疫系统的“无应答性”保障了“同种半异体”胎儿的安全，使妊娠得以维持。然而，妊娠过程中母胎界面大量免疫细胞的动态性浸润，局部高水平细胞因子/趋化因子微环境的出现，均表明妊娠母体免疫系统针对胎儿并非无应答，而是处于“激活”状态。由此推测，母胎界面应当存在“局部特定”的免疫抑制机制，也被称为母胎耐受的第四种机制（表 1），对这一新机制的阐述将有助于对妊娠生理及病理的深入理解。

表 1　妊娠时母体免疫系统调控机制

假设类型	机制	可能的效应结果
Medawar 假说	母胎嵌合	中心耐受
（1）母体免疫系统无应答	滋养层	免疫忽视
（2）母胎间解剖性屏障		
（3）胎儿表达同种异体抗原受抑制	经典 MHC 分子缺失或降低	免疫忽视
局部特异性免疫抑制及防御	滋养层 Fas/FasL 表达	克隆删除
	补体调节分子	补体激活减弱
	腺苷代谢干扰	$CD4^{+}CD25^{+}$ Treg 细胞及 DC 抑制
	色氨酸代谢	克隆失能；克隆删除

续表

假设类型	机制	可能的效应结果
	细胞因子环境（Th2 应答）	非炎症免疫应答
	非经典 MHC 分子表达（HLA-G、HLA-E）	$CD4^+CD25^+$ Treg 细胞及 γδT 细胞的抑制；NK 细胞抑制；DC 及巨噬细胞的抑制
	TLR2、TLR3、TLR4	母胎界面免疫细胞及非免疫细胞防御

2. 科学意义

妊娠过程母体免疫系统“识别”半同种异体的胎儿，建立免疫耐受的机制是保障妊娠成功的关键。妊娠早期母体免疫细胞聚集于母-胎界面，形成针对半同种异体胎儿的耐受机制是最诱人的免疫学问题之一。阐述妊娠过程中母-胎界面免疫细胞及分子动态变化的规律，揭示妊娠局部免疫细胞的特征及“驯化”机制，不仅对阐明母-胎界面免疫耐受及防御机制的建立具有重要意义，而且将对补充并建立新的免疫耐受与防御理论具有重要的价值，为异常病理性妊娠防治与诊断提供新的策略。基于母胎界面“局部特定免疫”第四种机制的建立及深入阐述，也将为器官与细胞移植排斥等诸多免疫学领域难题的攻克提供新思路。

3. 最新进展

随着母-胎免疫耐受机制研究的进展，基于妊娠局部特定免疫耐受机制的研究，使人们对妊娠生理及病理的发生过程有了更深入的理解。随着免疫学、基因与蛋白质组学研究技术的发展及新的实验模型的建立，对母-胎界面特定微环境中免疫细胞如淋巴细胞、巨噬细胞及树突细胞等细胞群体的浸润机制及再分布特征与功能特性的研究取得了重要进展。动物实验研究已证实，删除母体特定免疫细胞群体如子宫 NK 细胞（uterine natural killer，uNK）、调节性 T 细胞（uterine regulatory T cell，uTreg）及树突细胞（uterine dendritic cell，uDC）或单核/巨噬细胞（uterine monocyte/macrophage，uMo/Mϕ）均可导致模型小鼠的妊娠失败。近年来对妊娠局部微环境中妊娠相关激素及非免疫细胞，如蜕膜基质细胞（decidual stromal cell，DSC）、滋养层细胞及蜕膜间充质干细胞（decidual mesenchymal stem cell，DMSC）“驯化”局部免疫细胞形成免疫负调控功能中作用及机制的揭示，对阐明独特的母胎耐受及防御机制，补充并建立新的免疫耐受理论具有重要意义。

4. 主要难点

基于妊娠局部特定的免疫耐受机制十分复杂，不仅涉及免疫细胞不同功能群体间的相互调节作用，还涉及妊娠相关激素及非免疫细胞等局部微环境主要组分的调节（图 1）。目前已获取的妊娠母-胎界面局部免疫细胞亚群及非免疫细胞群

体，特别是负调节性免疫细胞群体的系统性研究数据甚少，因而尚难以对妊娠过程母-胎界面免疫耐受形成的关键调控因素进行深入的阐述。母-胎界面浸润的免疫调节性细胞，如 Treg 细胞/Th-17 的平衡调节、髓样抑制细胞及耐受性 DC 等细胞亚群的动态变化规律、功能特征及其调控机制还存在许多困惑有待阐明。例如妊娠时母体循环中可出现高水平的瘦素（leptin），呈“瘦素化”状态，而在此阶段中瘦素的主要产生组织之一是胎盘，提示母胎界面也呈“高瘦素”微环境。然而，目前体内外的研究均证实，瘦素抑制 Treg 细胞的扩充及负性调节功能，促进 T 细胞的扩充，但多数研究均显示母-胎界面（妊娠早期）及外周循环中 Treg 细胞却显著扩充。对妊娠母体这些谜一样的问题的诠释将是揭示独特母-胎免疫耐受现象的关键。

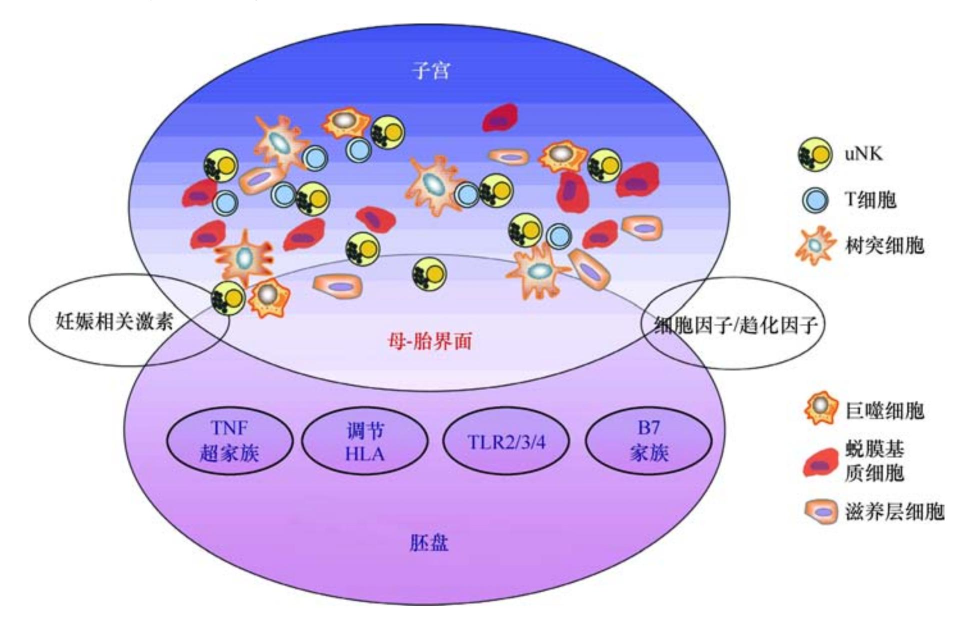


图 1　母胎免疫耐受及防御的部分机制

5. 展望

对妊娠母体特别是母-胎界面局部免疫细胞中负调节群体浸润特点、动态变化规律及其功能调节机制的揭示，是深入阐明母-胎免疫耐受的关键问题。随着细胞分析、分选技术、体外 3D 培养技术及高通量基因组与蛋白质组分析技术的发展，利用病理性妊娠动物模型及特定细胞群体删除或功能缺失策略，筛选鉴定母-胎界面特定免疫耐受的关键调节机制，有望对独特的母胎耐受及防御机制研究取得突破，补充并建立新的免疫耐受形成理论。胎盘的形成具有物种多样性，动物妊娠与人类妊娠在生理特征上有显著的不同。因此，深入系统地研究人类正常

及异常妊娠母-胎界面免疫细胞负性调节功能及其机制，不仅将为人类异常妊娠的防治等领域提供新的策略，也将为耐受的打破及脏器移植排斥等诸多免疫学领域难题的攻克提供新思路。

参考文献

Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. 2004. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. Nat Immunol, 5: 266～271

Ashley Moffett-King. 2002. Natural killer cells and pregnancy. Nat Rev Immunol, (9): 656～663

Dimitrov R, Kyurkchiev D, Timeva T, et al. 2010. First-trimester human decidua contains a population of mesenchymal stem cells. Fertil Steril, 93(1): 210～219

Howard JK, Cave BJ, Oksanen LJ, et al. 2004. Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. Nat Med, 10(7): 734～738

Koch CA, Platt JL. 2003. Natural mechanisms for evading graft rejection: the fetus as an allograft. Springer Semin Immunopathol, 25(2): 95～117

Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, et al. 1997. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. Nat Med, 3(9): 1029～1033

Medawar PB. 1953. Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. Symp Soc Exp Biol, 7: 320～328

Moffett A, Loke C. 2006. Immunology of placentation in eutherian mammals. Nat Rev Immunol, 6: 584～594

Plaks V, Birnberg T, Berkutzki T, et al. 2008. Uterine DCs are crucial for decidua formation during embryo implantation in mice. J Clin Invest, 118: 3954～3965

Takeshi Nagamatsu, Danny J. Schust. 2010. The contribution of macrophages to normal and pathological pregnancies. American Journal of Reproductive Immunology, (3): 231～242

撰稿人：曲　迅
山东大学齐鲁医院

天然免疫与获得性免疫分工合作、互相调控的基础是什么

Innate and Adaptive Immunity Cross-talk：What Is the Key Factor in the Regulation of the Immune Response

俄国科学家 Elie Metchnikoff（1845～1916）曾经在 1883 年发现一种可吞噬细菌的细胞称为吞噬细胞，可以在生命体内发挥免疫功能。一百多年后，美国科学家 Charles A Janeway Jr（1943～2003）发现模式识别受体可帮助吞噬细胞辨认病原菌的存在。几乎与 Metchnikoff 同时，德国科学家贝林发现抗体可以抵抗细菌毒素的毒性作用。20 世纪 60 年代，Miller 和 Mitchell 发现 T 细胞和 B 细胞协同作用可以产生抗体，同时细胞毒性 T 细胞也可直接攻击病原体，而且抗体和细胞毒性 T 细胞攻击病原体具有严格的特异性。由此，我们认识到生命体经过数十亿年的进化，形成了一套抵御病原菌侵犯的免疫系统，使机体能够有效地保护自己、清除异物。按照病原菌侵入后出现的时相和抗原特异性，可以把脊椎动物的免疫系统分为两类：天然免疫（又称固有免疫）和获得性免疫（又称适应性免疫）。天然免疫是机体的第一道防线，细菌、病毒感染，肿瘤细胞形成后，天然免疫会进行实时清除，一旦细菌、病毒和肿瘤细胞过度产生，天然免疫不足以清除时，获得性免疫即在 1～2 周后启动，发挥强大的特异性清除功能。在体内，天然免疫和获得性免疫间相互调控，分工合作，在微生物入侵时发挥不同的功能，共同维护着机体健康。

由于天然免疫系统与获得性免疫系统以不同的时相、不同的方式对细菌、病毒和肿瘤细胞产生应答，两者之间的精确调节显得尤为重要。许多让人们为之苦恼的疾病都与天然免疫和获得性免疫的应答失调有关，如系统性红斑狼疮、类风湿关节炎等自身免疫病，与多种免疫细胞功能失调、炎性细胞因子的过度分泌有关，而这种炎性因子的过度分泌则是由于免疫系统的过度活化造成的。然而，我们对如何协调指挥天然免疫和获得性免疫发挥应有作用缺乏必要的了解，迫切需要投入更多的研究。一旦我们能正确调节两大免疫系统的功能，几项重要的医学难题也会迎刃而解，如上调免疫功能可克服肿瘤免疫逃逸和病毒免疫逃逸，下调免疫功能可克服移植排斥反应和自身免疫性疾病。可见正确调节天然免疫和获得性免疫应答，具有重要的科学意义。

免疫学家经过数十年研究发现，天然免疫和获得性免疫有分工、有互补、有合作。吞噬细胞通过模式识别受体，识别病原相关分子模式，启动活化信号，吞

噬消化病原菌；自然杀伤细胞（NK 细胞）释放穿孔素（perforin）及粒酶 B 进行直接杀伤；树突细胞（DC）会对病原菌的成分进行加工，通过相应的 MHC 分子将携带着病原菌的信息提呈到细胞表面。随后，树突细胞进入外周淋巴组织，与 T 细胞的特异性抗原受体相互作用，启动获得性免疫系统。其中活化后的 Th1 细胞分泌 IFN-γ，进一步激活巨噬细胞，增强其吞噬功能，协同清除胞内微生物；Th2 细胞分泌 IL-4、IL-5、IL-13 等细胞因子辅助 B 细胞分泌特异性抗体，在抗体与相应抗原结合时，能够通过经典途径激活补体，增强其裂解效应；$CD8^{+}$ T 细胞分化为细胞毒性 T 细胞，识别被侵染的靶细胞并将之杀伤。

但是，上述“战斗”过程发生在体内，如果“战斗力”过强，则会发生机体的损伤。例如系统性红斑狼疮、类风湿关节炎是由于免疫系统对自身组织发起“攻击”而造成的，乙型肝炎是由于免疫系统在清除肝细胞中的乙肝病毒时造成的肝脏损伤，非典型性肺炎是由于免疫系统在清除肺泡中的 SARS 病毒时造成的肺脏损伤。因此，要把“提高机体的免疫力”纠正为“调节机体的免疫力”，只有机体的免疫功能在正常范围内发挥作用，才能保证机体的健康。我们已发现体内存在一些具有免疫调节功能的免疫细胞，如调节性 T 细胞（Treg）。体内 Treg 细胞过多对打击肿瘤或病毒不力，过少则导致自身免疫病的发生。因此，如何协调指挥天然免疫和获得性免疫发挥应有作用面临诸多难点：

（1）天然免疫与获得性免疫虽然有不同分工，但在对付同种异物时又能协同作战，那么，统一指挥这场“战斗”的中枢是什么？物质基础是什么？例如对外源性物质的识别，我们知道获得性免疫的识别是通过表面的特异性抗原受体 TCR 或 BCR 进行的，是具有高度特应性的精细识别。而天然免疫识别的分子大小不等、多种多样，是泛特异性的。这就提出了疑问，天然免疫是如何区分有害微生物和有益微生物的？解决这个问题对于研究病原体识别、过敏反应起因及常见疫苗的设计和应用将起到非常积极的作用。

（2）在免疫应答过程中，在什么时候、机体什么状态下固有免疫会诱发获得性免疫，天然免疫又是如何将信息交给获得性免疫的？对于这个问题的解答，能够优化现有的临床治疗方案，为疾病的治疗起到促进作用。

（3）机体的免疫应答最终要达到什么程度，在什么样的情况下开始反馈抑制免疫应答？我们已经对调节性 T 细胞有了一定的了解，但是免疫系统究竟如何下调免疫应答从而控制机体的稳定也并不清楚。研究固有免疫与获得性免疫的负向调控作用能够揭示免疫活化引起的机体损伤的原因，从而为控制相关疾病的发生发展提供帮助。

（4）由于已经发现小鼠 NK 细胞存在免疫记忆现象，于是我们可以猜想是否固有免疫系统可能也具有记忆现象？研究固有免疫对病原体的记忆能够为新型疫苗的研究提供新的方向。

参考文献

Akiko Iwasaki. 2010. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. Science, 327:291～295

Janeway CA Jr, Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. Annu Rev Immunol, 20:197～216

Kasper Hoebe. 2004. The interface between innate and adaptive immunity. Nat Immunol, 5: 971～974

Medzhitov R, Janeway CA Jr. 2000. How does the immune system distinguish self from nonself? Semin Immunol, 12:185～188

Miller JF, Mitchell GF. 1967. The thymus and the precursors of antigen reactive cells. Nature, 216:659～663

Mitchison NA. 2004. T-cell B-cell cooperation. Nat Rev Immunol, 4:308～312

撰稿人：魏海明
中国科学技术大学

炎性复合体是如何活化并在炎性疾病中发挥作用的

Inflammasome Activation and Its Function in Inflammatory Diseases

天然免疫是人体防御病原体的第一道防线，是人体生来就具有的，当外来病原体入侵后，天然免疫系统最早发生反应并具有排除异物的能力。机体第二道防御体系称获得性免疫，它能特异性识别侵入体内的抗原异物，有针对性地加以排除。从天然免疫到获得性免疫，其中起桥梁作用的就是炎症应答。外来病原体侵入机体后，天然免疫系统的巨噬细胞和树突状细胞，通过吞噬异物、提呈抗原及释放炎性介质召唤其他免疫细胞，从而达到清除病原体或启动特异性免疫应答的目的。

然而，天然免疫是如何快速启动、快速应答的？这一问题一直是近百年来困扰免疫学界的难题。直到 20 世纪 90 年代，人们才对天然免疫识别有了本质的认识。天然免疫系统的细胞通过相应的模式识别受体（pattern recognition receptor，PRR）识别各种病原体的保守结构，即病原体相关分子模式（pathogen associated molecular pattern，PAMP）及内源性危险信号，从而介导炎症应答。PRR 主要包括 Toll 样受体（Toll-like receptor，TLR）、核苷酸结合寡聚化结构域样受体［nucleotide-binding oligomerization domain（NOD）-like receptor，NLR］、视黄酸诱导基因-Ⅰ样受体［retinoid acidinducible gene Ⅰ（RIG-Ⅰ）-like receptors，RLR］及 C 型凝集素受体（the C-type lectin receptor，CLR）等。这些模式识别受体存在部位各异，功能也各不相同，其中 NLR 存在于胞质中，能够识别胞质内不同的 PAMP 和内源性分子。NLR 蛋白家族（NLR protein，NLRP）是 NLR 中最大的亚家族，由 14 个成员组成，大多数的功能还不清楚。一些 NLRP 活化后与半胱氨酸蛋白酶 caspase-1 及接头蛋白组成多分子复合物，被称为炎性复合体（inflammasome）。复合体活化的 caspase-1 通过对 IL-1β 和 IL-18 的前体进行剪切，进而释放大量成熟的 IL-1β 和 IL-18 参与炎症反应。因此，炎症复合体对促炎性细胞因子的产生具有重要的调节作用。

炎性复合体存在于细胞内，对于细胞内病原体和危险信号的识别及诱导产生天然免疫应答起着至关重要的作用。近年来，关于炎性复合体的活化、功能的发挥和调节的研究已经取得突破性进展。然而炎性复合体组装与活化的精确分子机制、在体内炎症应答中如何发挥作用及在免疫性疾病中的效应机制仍不十分清楚，这些问题也是目前天然免疫应答研究中的热点和焦点。为了研究炎性复合体

的活化及其作用，人们主要从以下几个方面去探索：一是要明确哪些分子可以组成炎性复合体；二是寻找炎性复合体活化的刺激因素；三是寻找炎性复合体与炎性疾病的直接关系；四是通过人工干预炎性复合体的形成进行相应炎性疾病治疗。

第一个难点，炎性复合体组成的研究，人们已经取得部分成果。如根据组成复合体的 NLR 种类的不同等，先后发现了 NLRP、NLRC4 及 AIM2 炎性复合体等。但是，机体内是否还有更多种类的炎性复合体，则需要利用蛋白质组学，通过分子水平的相互作用研究，去寻找更多的新的炎性复合体。另外，这些炎性复合体仅仅是炎症应答的中介物，还是也具有细胞内介导特定信号转导功能的复合体，可以激活特定的基因转录？这一问题则需要结合特定炎性刺激物诱导的特定生物学效应，来寻找更深层次的分子作用模式。

第二个难点，炎性复合体活化刺激因素的寻找，人们也取得了较大的进展。这其中对 NLRP3 炎性复合体的研究较多，NLRP3 也称 NALP3、Cryopyrin、PYPAF1、CIAS1 及 CLR1.1。人们通过对病原体感染研究发现，细胞在受到各种病原体及其他刺激物作用后，可促进炎性复合体的形成（图 1），例如细菌内毒素 LPS、细菌 RNA 及肽聚糖等 PAMP 可以通过 TLR 途径活化 NLRP3 炎性复合体。近年备受关注的危险相关分子模式（danger-associated molecular pattern，DAMP），包括三磷酸腺苷（ATP）、活性氧簇（reactive oxygen species，ROS）及尿酸晶体（uric acid crystal，UAC），则通过与危险信号受体（the danger signal receptor，DSR）结合活化 NLRP3 炎性复合体、促进炎性细胞因子释放。最近有学者发现二氧化硅、铝盐及 β-淀粉样蛋白也可以活化 NLRP3 炎性复合体，主要通过诱导溶酶体通透性增加释放组织蛋白酶 cathepsin B，进而诱导 NLRP3 炎性复合体形成。尽管人们发现多种因素可以诱导炎性复合体形成，但各因素通过什么样的方式直接诱导复合体活化仍然不清楚，而且每类病原微生物是否刺激特定种类的炎性复合体形成，炎性复合体是否是介导天然免疫识别自己和非己的关键性复合物也未知。要阐述这些问题，需要科学家对大量的病原微生物活化炎性复合体进行更系统的比较研究。希望不久的将来能获得令人满意的结果，并能进一步揭示天然免疫识别非己的机制。

第三与第四个难点，寻找炎性复合体与炎性疾病的直接关系，从而通过人工干预炎性复合体的形成及功能进行相应疾病的治疗，是人们研究炎性复合体的最终目标。有关炎性复合体活化与疾病发生、发展的关系，在过去的几年间研究较多的是炎性及免疫性疾病，包括肠炎、动脉粥样硬化、周期性发热综合征及白癜风。由刺激因素诱发的炎性复合体依赖的 IL-1β 的产生还与一些特殊疾病的发生密切相关，如痛风、假性痛风、石棉沉着症、硅沉着肺及阿尔茨海默病等。NLRP3 自发性的显性突变与一些比较罕见的自身炎性疾病，如寒冷诱发的自发性

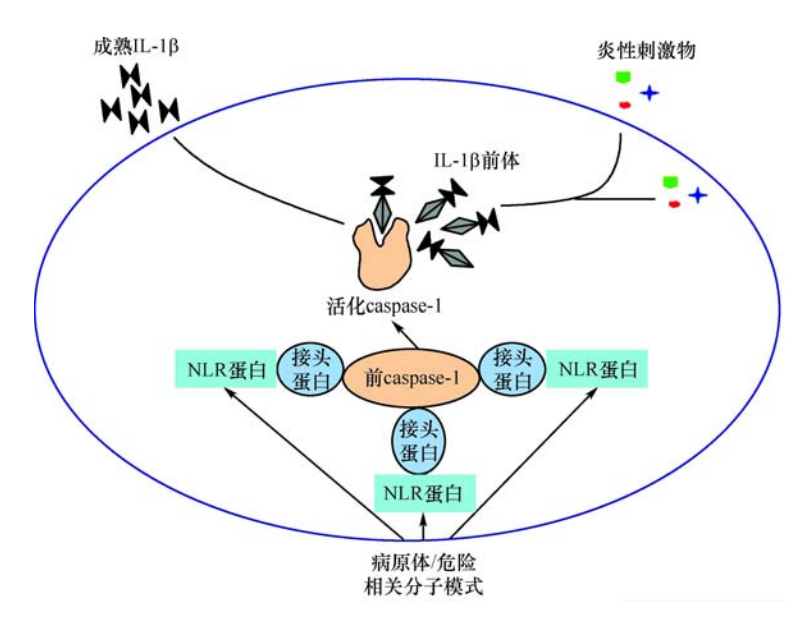


图 1　炎性复合体的形成及其作用

炎症综合征、穆-韦（Muckle-Wells）综合征及多系统炎性疾病的发生密切相关。疾病相关的 NLRP3 突变导致 NLRP3 炎性复合体的持续活化，从而引起 caspase-1 活化亢进和 IL-1β 分泌增加。对于这些患者应用 IL-1β 受体拮抗剂可以减轻临床症状，加速病情好转。最近应用 NLRP3 基因敲除鼠，发现炎性复合体还与肿瘤的形成有关。因此，细胞水平和动物模型的研究，如炎性复合体基因敲除鼠的应用，为我们提供了阐明 NLRP 炎性复合体与疾病关系的机遇，但如何通过体内干预炎性复合体的形成和功能来治疗疾病仍是尚待解决的一项难题。

有关天然免疫识别机制研究的进步，不仅包括对模式识别受体的认识，还包括炎性复合体概念的提出，使人们对胞内危险信号的识别及炎性细胞因子产生的关系有了更系统的了解。但是，细胞内是否存在多种类似炎性复合体的功能单位及这些复合体形成和活化的精确分子机制仍然需要我们去研究。另外，病原体直接激活炎性复合体的分子机制及炎性复合体是否一定引起炎性疾病，随之而来的就是调控炎性复合体功能的药物是否可以治疗炎症及炎症相关的疾病？这些问题也需要我们在未来的研究中去解答。相信在不久的将来，通过对炎性复合体组成与活化，以及其在炎症和相关疾病中的作用机制研究，必将带来炎症及天然免疫应答研究领域的新突破。

参 考 文 献

Allen IC , Tekippe EM , Woodford RM ,et al. 2010. The NLRP3 inflammasome functions as a negative

regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. J Exp Med,207(5): 1045～1056
Duewell P, Kono H, Rayner KJ,et al. 2010. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. Nature,464(7293): 1357～1361
Franchi L, Eigenbrod T, Munoz-Planillo R,et al. 2009. The inflammasome: a caspase-1 activation platform regulating immune responses and disease pathogenesis. Nat Immunol,10(3): 241～247
Hornung V, Bauernfeind F, Halle A,et al. 2008. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. Nat Immunol, 9(8):847～856
Ichinohe T, Pang IK, Iwasaki A. 2010. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. Nat Immunol,11(5): 404～410
Martinon F, Burns K, Tschop J. 2002. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-β. Mol Cell,10(2): 417～426
Martinon F, Petrilli V, Mayor A,et al. 2006. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. Nature,440(7081):237～241
Rathinam VA, Jiang Z, Waggoner SN,et al. 2010. The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. Nat Immunol,11(5): 395～402
Schroder K, Tschopp J. 2010. The inflammasomes. Cell,140(6): 821～832
Siegmund B. 2010. Interleukin-18 in intestinal inflammation: friend and foe? Immunity,32(3): 300～302

撰稿人：柳忠辉　王轶楠
吉林大学

机体是如何识别移植抗原引发器官移植排斥反应的

The Mechanism of Alloantigen Recognition and Transplant Rejection

1. 背景

器官移植是解决器官终末期病变唯一有效的方法，但同种或异种之间进行器官移植均会发生移植排斥反应，导致移植物的排斥失活。20 世纪 80 年代后，基于移植抗原免疫识别与应答机制的认识开发出新型免疫抑制剂环孢素（cyclosporine A，CsA）等，这些抑制剂的使用有效地控制了移植后急性排斥反应，明显延长移植物的存活期。然而目前临床排斥反应的问题仍没有完全解决，绝大多数移植器官在移植 5～10 年会由于慢性排斥反应而丧失功能。其中关键的问题在于人们对机体是如何识别移植抗原并引发排斥反应的免疫学机制认识的局限性，限制了相应的治疗方法和手段的突破，成为影响移植器官长期存活的主要难题。

2. 科学意义

虽然科学家为解决移植物存活的问题付出了艰辛的努力，但直到 20 世纪 40 年代器官移植失败的真正原因仍不为人知。20 世纪 40 年代，Medawar 受英国医学会战伤委员会的委派解决战争烧伤后同种皮肤移植失败的难题，在总结前人经验和自己的研究后，提出了移植排斥的本质是免疫系统针对供者移植抗原产生的免疫应答的理论，从而为解决移植排斥指明了方向。随着免疫学的发展，特别是 20 世纪 70 年代 MHC（major histocompatibility complex，MHC）的发现，人们逐步认识到 MHC 是不同个体间器官移植后被机体识别、引发排斥反应的移植抗原，而机体对移植抗原的免疫识别和应答机制是移植免疫学的研究主题。但一直以来，机体是如何识别移植物抗原并引发排斥反应的机制存在诸多令人困惑的问题。因此，通过认识移植抗原免疫识别诱发排斥反应的新机制，将有利于移植排斥反应特别是慢性排斥防治方法的突破，解决移植物不能长期存活的问题。

3. 最新进展

机体识别移植抗原诱发排斥反应的机制复杂。最初认为器官移植后，移植物的脱落细胞经过受者 APC（recipient APC，rAPC）处理后，以 MHC 限制的形式将供者抗原肽/受者 MHC 分子复合物提呈给受者 T 细胞，介导移植排斥反应（图 1A），此过程称为间接识别（indirect allorecognition）。由间接识别介导的免疫应答具有初始免疫应答反应慢与弱的特点，在急性排斥反应中晚期和慢性排斥反应中起重要的作用。但是，器官移植后往往在短期内发生强烈的排斥反应，这

种现象与间接识别诱发的初始免疫应答的特点不符，也提示移植后存在其他识别抗原活化 T 细胞的新机制。实验发现，将供、受者间 MHC 错配的淋巴细胞培养后可互相激活产生混合淋巴细胞反应（mixed lymphocyte reaction，MLR），使人们逐步认识到机体存在直接识别（direct allorecognition）机制，即移植后供者 APC（donor APC，dAPC）将其 MHC 分子或抗原肽/MHC 分子复合物（pMHC）直接提呈给受者 T 细胞，并产生免疫应答的过程（图 1B）。直接识别是由于移植物中残留的过客白细胞（passenger leukocyte）特别是树突细胞（dendritic cell，DC），在移植物血管接通后进入局部淋巴组织，直接激活 T 细胞引发排斥反应。由于 dAPC 与受者 T 细胞间 MHC 不同，因此直接识别机制与经典 MHC 限制理论相悖。那么，T 细胞是如何跨越 MHC 限制性而直接识别移植抗原的？现代免疫学研究发现，T 细胞抗原受体（T-cell antigen receptor，TCR）识别 pMHC 复合的结构特点及体内存在记忆性 T 细胞（memory T cell，Tm）是直接识别移植抗原的基础。TCR 既可识别外来抗原肽/自身 MHC 复合物，同时也发现 TCR 对 pMHC 的识别具有简并性和包容性等特点，使同一 TCR 可通过改变构型识别不同的 pMHC，成为直接识别的分子机制。另外，参与初次排斥的 T 细胞中既有初始（naïve）T 细胞，也有体内预存针对某些抗原的 Tm 克隆，在急性排斥反应早期发挥重要作用，这些 Tm 是由于机体在术前已接触过某些抗原的刺激（如微生物感染等）形成的。由于个体生存环境所接触的抗原不同，个体间的 Tm 克隆 TCR 所识别的抗原种类有差异。因此，不同个体由于 MHC 多态性的遗传背景和环境因素差异，体内参与直接识别的 Tm 数量、亚群和功能亦各异，由此导致临床排斥反应的强度和类型不同，导致移植物存活期也各异。除了直接和间接识别外，是否还有其他的方式？最近有学者提出了半直接识别（semi-direct allorecognition）机制的观点，指移植物脱落细胞经 rAPC 处理后，将供者抗原肽/受者 MHC 复合物提呈给受者 $CD4^+$ T 细胞；同时，dAPC 进入受者体内与 rAPC 相互作用后以膜转移或以外核体（exosome）的形式直接将供者 MHC 转移给 rAPC。此时，rAPC 也可以直接识别形式激活 $CD8^+$ T 细胞，介导排斥反应（图 1C）。半直接识别机制是对直接和间接识别的补充，但仍然有待于进一步的证实。

器官移植后除了移植抗原介导特异性的排斥反应外，其他的因素如微生物、损伤的组织细胞所释放的危险素等是否影响抗原特异性的排斥反应？免疫细胞又是如何识别危险素的？这与新近发现存在于 APC 表面的识别病原体及危险素的模式识别受体（pattern recognition receptor PRR）有关。初步的研究证实通过相应的 PRR 识别各种病原体相关分子模式（pathogen associated molecular pattern，PAMP）和损伤细胞释放的危险素或损伤相关模式分子（damage associated molecule pattern，DMAP）包括高迁移率族蛋白（high mobility group box1，

HMGB1)、热休克蛋白（heat shock protein，HSP）等，介导天然免疫炎症反应，从而影响移植排斥反应的强度和类型。这一机制的发现使人们对移植后的免疫识别引发排斥反应的机制有了新的认识。

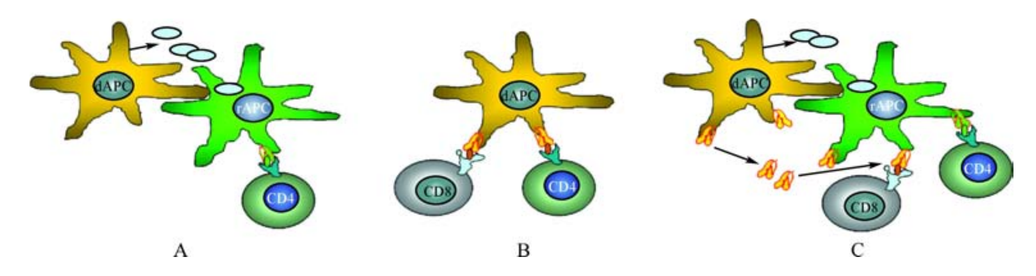


图 1　移植抗原的免疫识别机制

A. 间接识别；B. 直接识别；C. 半直接识别

4. 主要难点

由于免疫系统是体内具有精确识别“自我”与“非我”物质完整而独立的系统，参与免疫识别的细胞、分子和基因组成复杂，且不断有新的细胞亚群和新的分子发现影响人们的认识，因此免疫系统识别移植抗原引发排斥反应的机制还有很多未知的问题有待认识。例如，间接和直接识别过程中形成的 Tm 是否在慢性排斥中发挥作用？Tm 与新近发现的炎症反应 Th17 细胞分化的关系及是否在慢性排斥反应中发挥重要作用？另外，目前已发现六大类 PRR，包括 Toll 样受体（Toll-like receptor，TLR）、维 A 酸诱导基因 Ⅰ 样受体（RIG-Ⅰ-like receptor，RLR）、核苷酸结合寡聚化结构域样受体（NOD-like receptor，NLR）等，分布在细胞表面、内体、溶酶体或胞质内，识别不同的 PAMP 和 DMAP。但对这些 PRR 是否参与移植后的免疫识别、如何识别和影响排斥反应的机制等也都缺乏研究和认识。因此，通过免疫识别新机制的进一步研究和突破，将对排斥反应的防治产生革命性的影响，最终解决移植物不能长期存活的问题。

参 考 文 献

Behdad Afzali，Giovanna Lombardi，Robert I. 2008. Pathways of major histocompatibility complex allorecognition. Current Opinion in Organ Transplantation，13：438～444

Benichou G. 1999. Direct and indirect antigen recognition：the pathways to allograft immune rejection. Front Biosci，15(4)：476～480

Briscoe DM，Sayegh MH. 2002. A rendezvous before rejection：where do T cells meet transplant antigens? Nat Med，8(3)：220～222

Colf LA，Bankovich AJ，Hanick NA，et al. 2007. How a single T cell receptor recognizes both self and foreign MHC. Cell，129(1)：135～146

Gould DS，Auchincloss H Jr. 1999. Direct and indirect recognition：the role of MHC antigens in

graft rejection. Immunol Today, 20(2): 77～82

Kreisel D, Krupnick AS, Gelman AE, et al. 2002. Non-hematopoietic allograft cells directly activate $CD8^+$ T cells and trigger acute rejection: an alternative mechanism of allorecognition. Nat Med, 8(3): 233～239

撰稿人：王全兴　曹雪涛
第二军医大学

人类染色体的折叠机制

The Mechanism of Human Chromosome Folding

1. 背景

染色体（chromosome）是细胞中的遗传物质，主要包括一个线性的 DNA 双链分子及与其相结合的 RNA、组蛋白和非组蛋白等。显现于细胞分裂期的染色体和间期的染色质是同样遗传物质的不同折叠形式。染色体的折叠是一个多层次的过程。基于电子显微镜的观察，10nm 尺度的核小体模型作为染色体组装的基础已经被广泛接受。每个核小体包括有 8 个分子的组蛋白，外面缠绕着 146 个碱基对。相邻核小体之间有 DNA 序列相连接。核小体再进一步折叠起来，形成 30nm 粗的染色质丝。细胞分裂期间，染色质丝进一步紧密压缩，形成尺度为微米的染色体。细胞分裂结束后，染色体又松散为染色质，等待在下一个细胞周期中再次折叠压缩。人们对核小体的三维结构和组装已经比较了解了，但核小体以上层次的折叠机制还不甚明了。此前关于染色体的折叠有两种模型：一种为平衡球体（equilibrium globule），根据该模型得出染色体是高度压缩并且打结的结论；另一种为立体多层次球体（fractal globule）（图 1），认为染色体由很多线性相连的核小体缠绕塌缩而成，不存在打结。最近的研究结果对后一种折叠模型提供了有力的支持。

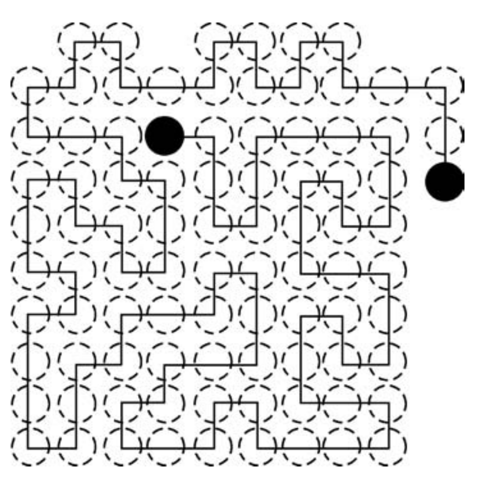


图 1　立体多层次球体模型在二维空间的示意　实心小球表示线性序列的终端，空心小球表示单个组装模块，如核小体等。黑色线为线性序列走向。引自 Grosberg A，et al. 1993. Lett

2. 科学意义

随着人类基因组测序计划的推进，生命科学的研究已经进入了后基因组时代。基因组测序计划的完成意味着我们将掌握控制人类遗传发育生殖及疾病健康等的序列信息。这些遗传信息的载体，即染色体，需要折叠成三维结构来执行其功能，包括基因的表达或沉默。因此，仅仅获得染色体核酸序列信息是不够的。对染色体的折叠机制展开深入研究，将能够揭示基因表达的调控机制及其在发育

或疾病中的作用，建立各种疾病与染色质结构变异的关联，并在此基础上探讨对人类疾病早期诊断的手段和有效治疗的手段。对染色体折叠机制的研究也将能够揭示表观遗传学和诱导性全功能干细胞的分子机制。

3. 最新进展

早在 1977 年，科学家就提出染色体折叠对于基因调控是有影响的。人类细胞中有 22 对常染色体和 1 对性染色体，但是不同染色质并不是混杂在一起的。相反，每条染色质在细胞核内都有相对专属的区域。染色质上又可分为基因富集区和贫乏区。通过在体荧光染色和基因连接图谱分析发现，基因富集区和贫乏区形成两个相对分开的区域。肿瘤细胞的研究表明，易发生交换重组的基因位点虽然在 DNA 序列上相隔很远，但在三维空间上彼此靠近。最近人们通过化学交联和 DNA 高通量测序的方法，能够对在三维空间上紧邻的同一条染色质或不同染色质上的 DNA 序列进行测定。相关研究结果表明，人类染色质可能压缩成一种没有打结的构象，这样可以很方便地在任何基因位点序列上压缩或伸展开，这实际上支持了立体多层次球体的染色体折叠模型。利用化学交联和 DNA 测序方法，人们已经构建了组成酵母基因组的 16 条染色质的三维空间结构（图 2），分辨率达到千碱基对。这样的三维结构为我们揭示人类染色质的折叠机制提供了起始模型。

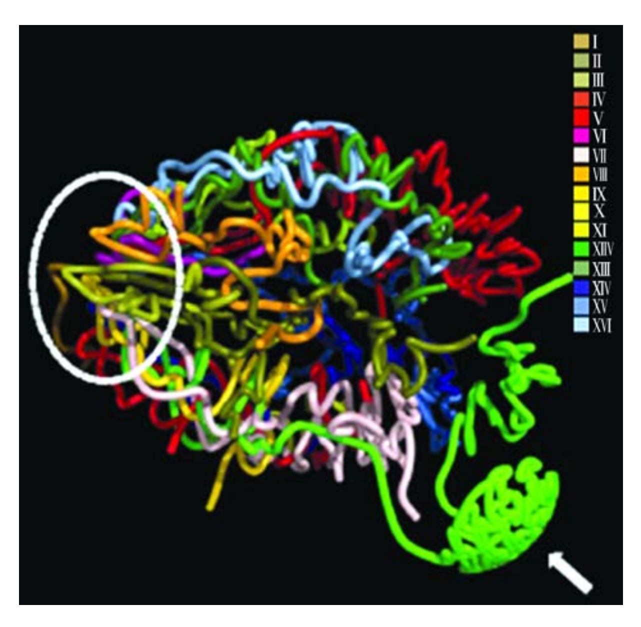


图 2　酵母基因组的三维结构

6 条染色质用不同的颜色标记。引自 Duan Z，et al. 2010. Nature

4. 主要难点

人类染色质更高分辨率的三维结构，对染色质动态变化的高时空分辨率捕捉，以及单个细胞水平上的染色体结构与功能相互关系的研究，都将是染色质折叠研究的难点所在。近年来发展起来的冷冻透射电镜技术和电子断层重构手段为染色质动态结构的研究提供了可能性。这项技术通过快速冷冻不同状态下的细胞来保持染色质的天然构象，经过电子透射后获得染色质的投影图像，再通过计算机图像处理就有可能获得染色质的三维结构，为染色体折叠机制的研究提供依据。

在染色体折叠机制研究中，DNA 局域高分辨结构信息对了解染色体结构功能关系也很重要。科学家们在蛋白质三维结构解析方面已经取得了很大成就，但在核酸序列的三维结构测定方面建树不多，特别是那些在基因表达调控方面发挥重要作用的特异 DNA 序列。利用 DNA 特异标记技术和电子显微镜三维重构手段，我们有可能对不同序列组成的 DNA 片段展开高分辨率三维结构研究。在积累了足够的这些三维结构信息以后，就有希望对较小尺度下（如从千碱基对到百万碱基对）的 DNA 三维结构做出比较准确的预测。同时我们还需要考虑与 DNA 相结合的组蛋白、非组蛋白及 RNA 对染色质三维结构的影响。

利用化学交联技术及高通量测序手段，结合冷冻电镜三维重构和高分辨率 DNA 局域结构，我们将有可能获得染色体折叠不同阶段的高分辨率三维构象，为揭示染色体折叠机制提供科学数据。

5. 展望

人类基因组测序计划的完成使得我们进入了后基因组时代。测序工作的完成在很大意义上是很多新工作的开始。对染色质折叠机制的深入了解，将打开一个全新的领域，为我们更好地诊治各种遗传性疾病提供实验支持和科学依据。表观遗传学中生物化学手段的使用和功能的研究揭示了蛋白质或核酸的修饰对基因表达的影响。不久的将来我们就可能对蛋白质或核酸修饰引起的染色质折叠变化展开研究，并有可能建立起染色质折叠与基因表达甚至疾病的关联。在这基础上，通过药物或小干扰 RNA 等手段对染色体的三维构象做精确调整以调控发育或治疗疾病，这也许并非是遥不可及的梦想。

参 考 文 献

Boutanaev AM, Mikhaylova LM, Nurminsky DI. 2005. The pattern of chromosome folding in interphase is outlined by the linear gene density profile. Molecular and Cellular Biology, 25(18): 8379～8386

Duan Z, Andronescu M, Schutz K, et al. 2010. A three-dimensional model of the yeast genome. Nature, 465(7296): 363～367

Gandhi M, Medvedovic M, Stringer JR, et al. 2006. Interphase chromosome folding determines spatial proximity of genes participating in carcinogenic RET/PTC rearrangements. Oncogene, 25:2360～2366

Grosberg A, Rabin Y, Havlin S, et al. 1993. Crumpled globule model of the three-dimensional structure of DNA. Europhys Lett, 23(5):373～378

Lieberman-Aiden E, van Berkum NL, Lander ES, et al. 2009. Comprehensive mapping of long range interactions reveals folding principles of the human genome. Science, 326(5950):289～293

Naumova N, Dekker J. 2010. Integrating one-dimensional and three-dimensional maps of genomes. Journal of Cell Science, 123:1979～1988

Ohmido N, Fukui K, Kinoshita T. 2010. Recent advances in rice genome and chromosome structure research by fluorescence in situ hybridization (FISH). Proc Jpn Acad, 86:103～116

Vaughan S. 1977. A theory for genetic regulation by chromosome. Nature, 269:86～87

撰稿人：陈　荣
中国科学院上海巴斯德研究所

组织工程、组织/器官生物学培养、原位再生，哪条道能捷足先登

Which Is the Best Way for Repair of Destroyed Tissue/Organ

人体组织/器官损毁后如何修复？目前主要的研究思路有三条（图1）：一是组织工程的方法；二是在体外纯生物学方法的组织/器官培养（以下简称为“组织/器官生物学培养”）；三是原位再生。根据不同组织/器官的不同特点，也可能采用这三条思路结合或混合的方法。

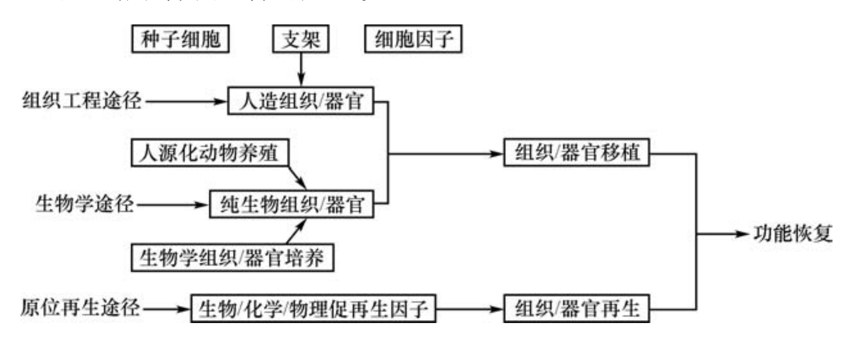


图1　损毁人体组织/器官功能修复的主要途径示意

1. 组织工程

组织工程是在原来的生物材料研究基础上拓展而成的一个研究领域。原来的生物材料领域，采用人工材料或生物材料制作人工组织或人工器官，用于替代或部分替代损毁了的人体组织或器官。这方面有许多已广泛应用并为大众熟知的例子，例如用金属或陶瓷制作的假牙、金属制作的人工骨、无定型碳或动物心包膜制作的人工心瓣、透析用的高分子膜（人工肾）等。

目前普遍采用的组织工程学的定义：组织工程是综合运用工程学和生命科学的原理研发修复、替代、改善人体组织或整个器官功能的生物替代物的一个交叉学科领域。组织工程的基本方法是将体外培养扩增的欲修复组织/器官的细胞或对其生长起支持作用的其他细胞（统称为“种子细胞”）种植于与欲替代组织/器官形状和结构类似且预先放入了有利于植入体存活并发挥功能的细胞生长调节因子等生物分子的“支架”上，制成生物替代物，植入人体组织/器官的病损部位，逐步形成新的、形态功能与欲修复组织/器官类似的组织/器官，达到组织/器官

再生的目的。在组织工程的研究中，如何制备具有良好生物相容性和降解性且结构与原来病变组织/器官类似的支架，如何获取适当的种子细胞，如何制备细胞生长调节因子并放入支架，都是研究的热点。除了欲修复组织的细胞和对组织再生起支持作用的细胞以外，具有分化成多种细胞潜能的各类干细胞也是种子细胞的可能选择。

2. 组织/器官的纯生物学培养和移植

组织/器官生物学培养方法与组织工程方法的一个重要区别就是这个方法无须支架材料。理论上这里也可以有两条主要途径：一是将患者自身具有多向分化潜能的干细胞类细胞培养成组织/器官；二是将动物（如猪）作为器官移植的供体。以目前的科学水平，按照第一条途径在体外将干细胞培养成比较简单一点的组织（如皮肤）是可能的，但想培养出比较复杂一些的人体组织/器官（如肝、心脏等）还根本无法实现。按照组织工程的思路，可以预先制作具有所需形状的支架，然后在不同部位"种"上不同类型的细胞。但纯生物方法的组织/器官培养，要让最初的少数干细胞最终长成具有特定复杂形状、由不同类型细胞组成的较复杂的器官，就必须对人细胞分化、生长、迁移、器官形状控制等发育生物学基本规律有透彻的了解。第二条途径的主要问题：一是动物器官移植到人身上以后产生的免疫排斥反应导致移植器官的失效；二是供体动物本身潜在的某些疾病如病毒性疾病，可能会通过器官移植传染接受器官移植的患者。对于免疫排斥问题，目前研究得较多的解决办法是将供体动物与免疫排斥反应有关的一些细胞表面蛋白质的基因换成人的基因，这种方法被称为"(基因）人源化"。免疫抑制剂也是抑制人体免疫排斥反应的一种重要辅助方法。接下来，人源化动物器官的安全性就成了这一方法面临的最大问题。

3. 原位再生

理论上来说，原位再生的途径对于因意外事故而造成组织/器官损毁的原本较健康的患者似乎是最理想的。这里的主要问题是如何使损毁的组织/器官再生。人类组织/器官本身就有一定的再生和自我修复能力，但不同组织/器官的再生能力有很大差别。一般来说，人的某个组织/器官受到损伤后，体内往往会产生两类方向相反的反应，即促进自我修复的反应和抑制自我修复的反应。如何通过施加一些生物、物理和化学因子最大限度地激发人类自身组织/器官的再生潜能，抑制那些对再生不利的因素，使损伤组织/器官能顺利自我修复，是一个需要长期研究的课题。与此相关的另一个基础研究领域是那些具有极强自我修复能力的动物（如蚂蟥、蜥蜴、涡虫等）的组织/器官再生和自我修复机制研究。如果能弄清这些相关机制并设法将这方面的知识应用到人组织/器官再生中来，原位再生或许会成为对由于意外事故组织/器官损毁的患者比较理想的治疗方式。

目前，在再生医学或组织/器官修复领域，沿上述三条思路的研究都在向前

推进，高下难分。组织工程方法的好处是，不需要做到很完美就可以投入应用。从应用来说，它实际上已经占得某种先机。但组织工程替代物制作起来较费时、费力、费钱，尤其是比较复杂的器官，做起来代价很高。如果能解决安全性问题，通过饲养人源化动物将能比较容易地“制造”和提供移植所需器官。原位再生听起来是很理想的途径，但作为其基础的关键机制研究何时能取得突破，还无法肯定。而且，对于那些某种组织/器官因病而损坏的患者，由于他们本身维持这个组织/器官的能力就有问题，要靠自身的潜能再生，恐怕也非易事。

总之，组织工程、组织/器官的生物学培养、原位再生，哪条道能捷足先登目前尚难以预料。

另一个问题是：哪些器官能够通过哪些途径修复？现在看起来，除了大脑以外，其他器官似乎都有可能通过上述三条途径或其混合途径来修复。脑的局部损伤可能通过各种途径来部分地修复，但要用病人自身的干细胞在体外培养出一个新的完整的大脑来完全替代其严重损毁的大脑，目前看来似乎还不可能。当然，这也不是绝对的。可是，完全换了一个大脑的人还是原来那个人吗？

参 考 文 献

David KCC，Robert PL. 2000. Xeno：The Promise of Transplanting Animal Organs into Humans. New York：Oxford University Press，90～106

Francoise AR，Pierre S，Jack-Yves D. 2007. Xenotransfusions，past and present. Xenotransplantation，14(3)：208～216

Galis F，Wagner GP，Jockusch EL. 2003. Why is limb regeneration possible in amphibians but not in reptiles，birds，or mammals. Evol Develop，5：208～220

Langer R，Vacanti JP. 1993. Tissue engineering. Science，260(8)：920～926

Richard NP，Anthony D，David A，et al. 2009. Current status of xenotransplantation and prospects for clinical application. Xenotransplantation，16(5)：263～280

Slack JMW，Beck CW，Gargioli C，et al. 2004. Cellular and molecular mechanisms of regeneration in Xenopus. Phil Trans R Soc Lon B，359：745～751

Stocum DL. 2004. Tissue restoration through regenerative biology and medicine. Advances Anat Embryol Cell Biol，176：1～101

撰稿人：公衍道
清华大学

如何检测自由人的脑神经网络活动

How to Detect Brain Neural Network Activities of Free Running Human

要揭开人脑奥秘，人脑神经网络活动的检测是无法绕开的一个难题。

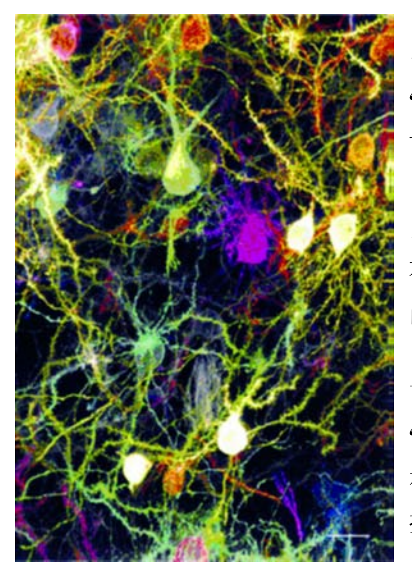


图 1　鼠脑神经网络的荧光图像

如果把人脑比作计算机，怎样才能弄清这台计算机的工作原理呢？首先需要弄清的是“硬件”。“人脑计算机”的硬件结构要远比目前世界上最复杂的计算机复杂得多。这不仅是因为人脑有上千亿的神经元，神经元的种类数以千计，每个神经元与成千上万的其他神经元有突触联系，还由于脑结构是动态的，神经元的数量、状态及神经元间的联系都在不断变化。

由于各种标记和追踪技术的发展，人类已经可望在不久的将来绘制出各种动物以至人类自身“脑计算机”的“硬件图”，即组成脑神经系统的神经网络线路图。图 1 是用荧光标记神经元后拍摄的相互连接的多个神经元的照片 。

与弄清“硬件结构”相比，破译这些“脑计算机”的“软件系统”和工作原理的任务则要困难得多。试想：如果你知道一台电脑的电路图，但对其原理一无所知，你怎么知道这台计算机在干什么？就算你已经知道原理，你又怎么知道计算机上此时此刻运行的是什么程序？

现在科学家们企图做的事情就是：记录脑神经网络在处理某个任务时每个神经元上的电生理活动，然后，在了解脑神经网络连接图的基础上，进一步分析脑神经网络的原理。这就相当于记录下某台计算机在执行某个任务时计算机中每个元件上电位随时间变化的过程，然后根据这些数据和计算机线路图来分析计算机的工作原理。可以想象，其难度无异于解读一堆数据量足以汗牛充栋的无字天书。但无论如何，第一步是要获得这些天书，也就是要记录脑神经网络在执行工作任务时其中每个神经元的工作数据。

这方面目前有两个主要的研究方向：一个是多微电极技术；一个是成像技术。多微电极技术，即采用集成电路的方法把多个微电极集成在一个芯片上。然

后，或把这个“多微电极”埋入脑内，实现多个神经元的同时记录，或在多微电极芯片上培养神经细胞，形成体外人工培养的神经网络，用多微电极实现对多个神经元的电生理信号的同时记录甚至“控制”（外加电刺激）。这种技术很难实现动物以至人脑中全部神经元活动的同时记录。

这里说的成像技术，是指近年来在生命科学领域中应用越来越广泛的活细胞内动态分子成像技术。脑神经网络活动动态记录的要求要比记录其他细胞内分子活动的要求更高，一是由于脑神经元每一瞬间活动的个体差异可能要比其他组织或器官的细胞大得多；二是动物神经网络活动的记录应该在动物完全自由和清醒的状态下进行，因为麻醉、麻痹等状态下记录的神经网络活动与正常状态下的记录可能有很大区别。

科学家已经意识到研究动物神经活动时保持动物清醒和自由的重要性，并且做出了不少努力来解决其中的技术问题。德国的一个小组长期以来一直致力于研究能够观察运动中动物脑神经元活动的装置，这台装置主要由一台微型双光子显微镜和图像信号传输光缆组成。原则上说，如果这种装置的空间分辨率、时间分辨率和探测深度能够进一步提高，用这种装置采集自由活动动物脑神经网络的活动已经是可以预期的事情。但是，这套装置中动物头上还连着一条光缆，动物并未处于完全自由的活动状态。要想探测动物在完全自由的状态下神经活动的规律，必须将这套装置变成遥感遥测装置。理论上这是可以实现的，现代信息技术已经可以把卫星或飞船上拍摄的数字图像传回遥远的地球。但要在小动物身上实现神经活动图像的无线传输，其中主要的困难是将这套装置中必须放在动物头顶上的图像采集和传出部分微型化。

对人的高级神经活动如人脑的思想、意识、情感、灵感、想象、幻觉的研究，目前还很难想象能找到相应的动物模型。因此，对于人的高级神经活动的研究，不可能完全用对模型动物的研究来代替。在上述这类对于自由活动动物脑活动进行探测的技术进一步发展成为一种遥感遥测技术以后，能否将这种技术直接移植到正常人身上？从伦理学上说，这里存在不少障碍：现代文明社会中，既不允许对正常人脑神经元进行荧光标记，也不可能把显微镜的部件植入正常人的颅内。可能的实验对象，除了需要进行脑疾病诊断的患者以外，也只能是献身科学的科学家自身了。

前述的动物脑成像技术中，为了使激发光和发射光能够穿过颅骨，需要在动物的颅骨上打一个孔，并用适当的透明材料代替去掉的那部分颅骨。这样，在整个成像系统中，就可以采用可见光及波长位于可见光两端的某些紫外光和红外光作为工作光。但是正常人颅骨不能打孔，而可见光又难以穿透颅骨，要探测活动中的人脑中神经网络的活动，需要采用可能穿透颅骨、头皮、脑膜等组织的其他波作为信息载体，如 CT 中用的 X 射线、正电子 CT（PET）中采用的 γ 射线及超声成像中用的超声波等，对人体组织都有一定的穿透能力。

除了穿透能力以外，还有一些其他的因素需要考虑。其中一个因素是安全

性，如X射线对生物组织可能有放射性损伤、射频电磁波会在生物组织中产生热效应等；另一个因素是要有相应的显微成像方法。可见光之所以能够显微成像，是因为可见光可以用光学透镜方便地聚焦；电子显微镜中采用的电子束之所以能够成像，是因为采用了可以对电子束聚焦的“电子透镜”；X射线CT之所以能够成像，是因为发展出了一个曾获诺贝尔奖的成像算法。进一步要考虑的因素还包括显微成像的空间分辨率和时间分辨率。分子成像要求很高的空间分辨率，因此采用的信息载体波必须有利于空间分辨率的提高。根据光学成像的基本原理，载体波波长越短，空间分辨率就越高。但近年来光学显微成像技术的研究中，也出现了各种“超分辨率”的技术，即光学显微成像所达到的空间分辨率超过了“光学衍射限”。这些研究领域的进展可能还会不断给我们带来惊喜。

成像的时间分辨率是人脑神经网络动态成像所面临的另一个巨大挑战，这里不再详述。

要将活体细胞内分子动态成像技术用到人脑，还有一个必须要解决的难题是神经元的标记问题。同样是由于伦理学的限制，不可能对正常人脑神经元进行荧光标记。这方面突破的可能性之一是所谓的免标记显微成像技术，例如美籍华人科学家谢晓亮研究的受激拉曼散射显微成像及目前空间分辨率还比较低的光学相干断层扫描成像（OCT）等，都属于免标记的显微成像技术。但哪种免标记的显微成像技术能够首先在空间分辨率、时间分辨率、探测深度等方面都达到人脑神经网络研究的要求，目前还难以预测。

从长远来看，脑神经网络活动遥测技术的研究是一把双刃剑，既可能为人类带来福利，也可能成为反人类势力监视、控制人类的邪恶手段。

参考文献

Freudiger CW, Min W, Saar BG, et al. 2008. Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy. Science, 322: 1857～1861

Gan WB, Grutzendler J, Wong WT, et al. 2000. Multicolor “DiOlistic” labeling of neuronal circuits using lipophilic dye combinations. Neuron, 27: 219～225

James HR. 2007. Beyond the diffraction limit: far-field fluorescence imaging with ultrahigh resolution. Mol BioSyst, 3: 781～793

Jon H. 2009. OCT technology development: where are we now? A commercial perspective. J Biophoton, 2 (6～7): 347～352

Sawinski J, Wallace DJ, Greenberg DS, et al. 2009. Visually evoked activity in cortical cells imaged in freely moving animals. Proc Natl Acad Sci USA, 106: 19557～19562

撰稿人：公衍道
清华大学

天然无结构的蛋白质的机制

The Mechanism of Intrinsically Unstructured Proteins

根据著名的 Anfinsen 定律，蛋白质的三维结构是由其氨基酸序列唯一决定的，即蛋白质折叠的所有信息都已经包含在其氨基酸序列中。因此人们普遍认为，每种蛋白质分子会折叠成与其氨基酸序列相应的唯一的三维构象，以便于行使其生物学功能。但是这种普适定律在自然界中也有例外存在，即自然界中有些蛋白质的亚基或单一多肽链本身在生理条件下并没有固定的三维结构，只有当它们与其他的生物大分子结合时，才能形成固定的结构。甚至有些蛋白质分子在与不同的配体相互作用时会形成完全不同的构象，从而行使不同的生物学功能。以上所述的这类蛋白质统称为天然无结构的蛋白质（naturally disordered protein，或 intrinsically unstructured protein）。

天然无结构的蛋白质经常肩负重要的生物学功能，例如通过特殊的蛋白质-蛋白质、蛋白质-核酸或蛋白质-配体的相互作用，参与信号通路或调控通路。另外，这些蛋白质由于没有固定的结构，往往作为翻译后修饰的靶标，通过乙酰化、羟基化、泛素化、甲基化和磷酸化等翻译后修饰手段，调控生物学过程。同时，天然无结构的蛋白质由于其结构上的灵活性，往往可以与多种配体结合，形成不同的结构，并行使不同的生物学功能。近来，对 Swiss-Prot 蛋白序列库的统计分析发现，在现有的 710 个与蛋白质功能相关的关键词中，310 个与有固定结构的蛋白质相关，238 个与无固定结构的蛋白质相关。目前普遍认为，天然无结构的蛋白质在生物学功能上可能与有固定结构的蛋白质是互补的：有固定结构的蛋白质通常参与催化和转运等过程；而无固定结构的蛋白质则在细胞信号的转导及转录和翻译的调控中起重要作用。

很多天然无结构的蛋白质在结合配体时往往经历构象变化，形成更加稳定的二级和三级结构，这一现象称为结合-折叠偶联（coupled folding and binding）。其中著名的例子为 cAMP 反应单元结合蛋白（cyclic-AMP-response-element-binding protein，CREB）的激酶可诱导的转录激活结构域（kinase-inducible transcriptional-activation domain，KID）。KID 多肽无论单独存在还是在 CREB 全蛋白中都是无结构的。但是当 CREB 与 CREB 结合蛋白（CREB-binding protein，CBP）结合时，KID 多肽折叠成一对正交的 α 螺旋，并与 CBP 紧密结合（图 1）。

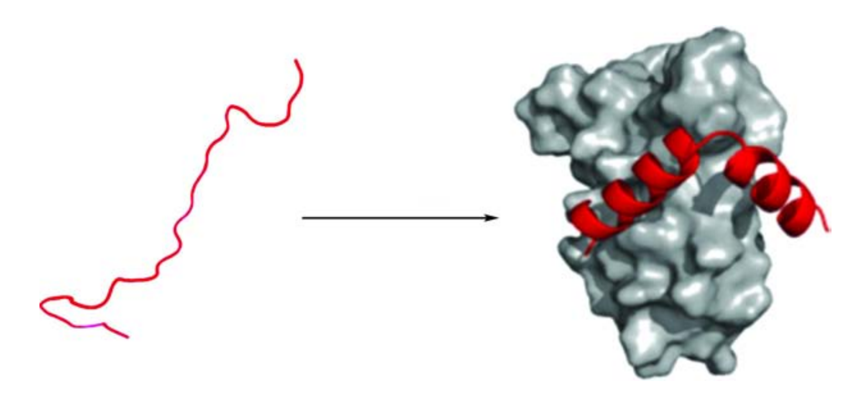


图 1　CREB 的 KID 结构域未与 CBP 蛋白结合时在溶液中没有固定结构，但是结合 CBP 蛋白（灰色）后，形成正交的 α 螺旋

结合-折叠偶联在热力学上有重要意义。通常特异性结合都要求蛋白质和配体间形成较强的特殊相互作用，因此结合反应是吸热过程，反应焓变 ΔH 远远小于零。但是通常转录因子等调控因子，为了便于调控，需要能与配体快速地结合和分离，因此结合反应通常较弱，其自由能变化应接近于 0。由热力学公式 $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ 可知，为满足以上要求（$\Delta H \ll 0$，$\Delta G \sim 0$），调控因子与配体结合时需要有较大的熵减（$\Delta S \ll 0$），而结合-折叠偶联机制恰好可以满足这一要求。因为伴随结合过程的折叠过程中，蛋白质的无序度减少，有序度增加，有较大的构象熵减。热力学上的解释也从一定程度上阐明了为什么天然无结构的蛋白质常常参与信号通路和调控通路。

另外，天然无结构的蛋白质在不与配体结合时往往结构上有较大的可塑性，即同一种无结构蛋白质可以在与多种配体结合时形成多种不同的构象，从而行使不同的功能。因此天然无结构的蛋白质在信号通路或调控通路中往往处于中心位置，其某些氨基酸位点的突变也常常导致相关的信号通路或调控通路的异常，从而引发疾病。另一方面，天然无结构的蛋白质很少形成疏水内核，常常将大部分氨基酸暴露在外，因此更适于作为药物研究的靶点。结合两方面的原因，对天然无结构蛋白质的结构和普遍作用机制的更深入的理解，不仅有助于对相关疾病的机制研究，而且可以辅助药物设计和研发，对国民经济和人民的健康都有重要意义。

既然蛋白质的折叠所需的所有信息都已经包含在其氨基酸序列中，那么天然无结构的蛋白质单独存在时无法形成特定的结构也是由其氨基酸序列决定的。通过统计分析正常蛋白质和天然无结构蛋白质的氨基酸序列发现，天然无结构蛋白质往往富含带电或极性的氨基酸，但是缺乏疏水氨基酸。因此可以想象，由于缺乏疏水残基，这些蛋白质很难形成疏水核心。另一方面，大量带电或极性基团倾向于与溶剂相互作用，致使这些蛋白质形成更为伸展的构象，而非正常蛋白质的

致密结构。氨基酸组分上的差异造成这些蛋白质无法形成稳定的三级结构。另外，很多天然无结构的蛋白质的氨基酸序列的复杂度较低，即氨基酸组分中少数几种残基的含量占统治地位。低复杂序列往往成为天然无结构蛋白质的标志，但是反过来，并非所有天然无结构蛋白质都含有低复杂度序列。根据天然无结构蛋白质在氨基酸序列上的特殊性，目前已经开发出很多计算机程序，通过读入蛋白质的氨基酸序列来预测该蛋白质是否天然无结构，如印第安纳大学的 Keith Dunker 等开发的 PONDR（http：//www．pondr．com）。其中最好的程序预测精度可以达到 69% ～78% ，已经能做出较为准确的预测。

使用预测算法搜索基因组序列，发现生物中天然无结构蛋白质的含量随生物的复杂性而升高。例如，古细菌和真细菌中天然无结构蛋白质的含量相似，但是真核生物中天然无结构蛋白质的含量大大升高；另外，多细胞真核生物中天然无结构蛋白质的含量也远远高于单细胞真核生物。在研究哺乳动物基因组时发现，75% 的信号蛋白被预测为含有超过 30 个残基的无序区域；所有蛋白质中半数以上含有超过 30 个残基的无序区，而 25% 被预测为完全无结构的蛋白质。因此，天然无结构的蛋白质很可能广泛地存在于生命系统中。

尽管近年来天然无结构蛋白质在科学界引起了极大的注意，而且越来越多的生物学家开始研究它们，但是还有很多问题困扰着生物学家们。例如，到底氨基酸序列中的何种信息导致这些蛋白质无法形成固定的结构？当前的预测精度仅约 70% ，如何更准确地从氨基酸序列预测这些蛋白质？为什么生物广泛地采用这一类蛋白质来行使生物学功能？天然无结构的蛋白质是完全没有结构，还是在几种可能的构象中切换，以至于实验手段无法检测其结构？以上这些问题还有待于进一步的研究。

参 考 文 献

Dunker AK , Silman I ,Uversky VN ,et al. 2008. Function and structure of inherently disordered proteins. Curr Opin Struct Biol ,18(6):756～764

Dyson HJ ,Wright PE. 2005. Intrinsically unstructured proteins and their functions. Nat Rev Mol Cell Biol ,6(3):197～208

Radivojac P , Iakoucheva LM , Oldfield CJ , et al. 2007. Intrinsic disorder and functional proteomics. Biophys J ,92(5):1439～1456

Romero P ,Obradovic Z , Li X ,et al. 2001. Sequence complexity of disordered protein. Proteins: Struct Funct Gen ,42(1):38～48

Ward JJ ,Sodhi JS , McGuffin LJ ,et al. 2004. Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life. J Mol Biol ,337(3):635～645

撰稿人：龚海鹏
清华大学

重要病毒入侵的分子机制

The Molecular Mechanism of Virus Entry

严重传染性疾病是由致病性微生物病原体所引起的。在国际卫生组织（World Health Organization，WHO）公布的世界十大人类疾病中，有近半数与传染性疾病相关，如流感、结核病、艾滋病等。而在所有目前已知的严重传染性疾病中，又以病毒引起的疾病类型最多、危害最大。据世界卫生组织统计，21 世纪初期全球传染性疾病造成的死亡人数已占全球总死亡人数的 25%，达到 1000 余万；而仅仅是 2009 年暴发的 H1N1 甲型流感，全球就投入数十亿美元进行防治工作（http：//www.who.int/en/）。而近年来在我国暴发的 SARS 和手-足-口病，更是给我们带来了极为深刻的记忆。因此，从分子水平上了解病毒入侵宿主细胞和复制的确切机制，不但可以帮助人类清晰地认识和了解病毒本身，更能够帮助人们以此为基础，设计、开发针对特定病原体的高效、特异的药物，对从根本上防治严重传染性疾病在全球的传播和暴发起着重要和关键的作用。

根据国际病毒分类委员会（International Committee on Taxonomy of Viruses，ICTV）统计，截至 2009 年，已发现 6 个目（order）共计 2288 种病毒，其中能够感染人及哺乳动物的已达数百种之多。虽然病毒种类繁多，但其生命周期一般可以分成侵染、复制和释放三个基本过程。

病毒的入侵是病毒感染复制周期中至关重要的第一步，对其机制的深入探讨是理解病毒感染的生物学、分子生物学和致病机制的关键。病毒入侵机制研究一直是病毒学基础研究的前沿和关键。研究较为透彻的是 HIV 包膜蛋白 gp160 和流感病毒血凝素蛋白 HA 介导的病毒入侵。HIV 包膜蛋白有两个亚单位：gp120 通过与细胞受体 CD4 和辅助受体 CXCR4/CCR5 的结合，实现病毒与细胞的吸附；gp41 通过形成 α-螺旋发夹三聚体（6 螺旋束）等一系列构象变化，实现病毒膜与细胞膜的融合，从而将病毒的遗传物质释放入胞，进而启动病毒基因表达、基因组复制等后续分子事件。流感病毒血凝素蛋白也有两个亚单位：HA1 与细胞唾液酸受体的结合介导病毒内吞；HA2 在胞内体低 pH 环境下形成 6 螺旋束融合核心结构，实现病毒膜与胞内体膜的融合，病毒遗传物质释放入胞。HIV 等逆转录病毒、流感病毒等正黏病毒、麻疹病毒等副黏病毒、埃博拉病毒等丝状病毒及 SARS-CoV 在膜融合时，其包膜蛋白均可形成 α-螺旋发夹三聚体

结构，称为Ⅰ型膜融合蛋白。而黄病毒科登革热病毒等的 E 蛋白则形成含有 β-折叠结构的发夹三聚体，称为Ⅱ型膜融合蛋白。最新研究发现，HSV gB 蛋白融合后结构既有 α-螺旋三聚体核心，又暴露出两个位于延长的 β-折叠顶端的融合环，称为Ⅲ（非Ⅰ、Ⅱ）型膜融合蛋白。三种类型的病毒膜蛋白的精细结构虽然不尽相同，但在诱导病毒-细胞膜融合功能方面却是类似的。对其分子机制进行比较研究和深度剖析，可望揭示病毒入侵宿主细胞的某些共性。同时，病毒入侵细胞是研究病毒抑制的理想靶位点，受体和病毒融合蛋白的许多作用位点及构象都与融合密切相关，任何能选择性地与这些位点或构象结合的配体，都可以有效延迟或阻碍病毒入侵，从而成为潜在的抗病毒药物。

虽然病毒的入侵对于认识病毒、开发抗病毒药物具有重要作用，但是长期以来存在的很多亟须解决的关键问题仍然限制着对这一过程的深入认识。这些问题主要集中在如下几个方面：

1. 细胞受体的发现

病毒入侵的细胞受体是了解病毒选择性侵染特异宿主细胞的关键因素。由于病毒在不同细胞上可以与不同表面分子结合，但哪些只是吸附因子、哪些是关键入侵受体尚有待发现和证实，有些病毒（如 HBV）甚至仍未发现特异的细胞受体。发现病毒的细胞受体及研究受体的分子识别机制，对于进一步研究病毒与细胞受体相互作用的分子机制等都具有重要意义。而且，阐明这些科学问题将有助于揭示不同病毒的入侵机制及规律，并为药物设计和新型疫苗研制提供科学依据和突破口。

2. 病毒入侵方式

病毒在结合相应的细胞受体后，可以通过直接和细胞膜融合（如 HIV）的方式，也可以经内吞后与胞内体进行膜融合（如流感病毒）的方式进入宿主细胞，从而开始生命周期的下一阶段。而病毒通过进入宿主细胞的机制和原因，不但是病毒学研究的关键问题，而且是进行抗病毒药物开发需要解决的一个关键问题。

3. 病毒-细胞膜融合机制

病毒与细胞膜融合的机制是研究病毒入侵的另一关键问题。在这一问题中，如何充分了解病毒蛋白的激活方式，包膜蛋白中决定细胞、组织嗜性和毒力的相关位点，以及入侵过程中病毒-宿主细胞蛋白的系统作用模式等问题，目前仍缺乏必要的实验结果，需要进一步的明确。

4. 病毒入侵的抑制模式

针对病毒入侵的抗病毒药物开发，其关键问题是寻找能够有效阻断细胞受体和病毒融合蛋白的相互作用，或者能够有效阻断病毒蛋白构象变化的化合物。而目前由于相应的药物筛选体系、活体动物模型等问题的限制，特别是诸如药物体

内代谢等药学方面的限制，使得寻找能够有效抑制病毒入侵的潜在药物的工作面临较大困难。

虽然对病毒入侵的认识还存在很多问题，但是由于根据此过程设计开发的药物、抗体等，有着从源头上彻底消灭病毒的独特优势，因此对于宿主细胞上病毒的受体发现及病毒与受体的相互作用机制的研究，都是病毒学研究的关键和难点问题。

参考文献

Baraniuk JN. 2010. Xenotropic murine leukemia virus-related virus in chronic fatigue syndrome and prostate cancer. Curr Allergy Asthma Rep, 7: 10～20

Chan DC, Fass D, Berger JM, et al. 1997. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. Cell, 89(2): 263～273

Lee JE, Fusco ML, Hessell AJ, et al. 2008. Structure of the Ebola virus glycoprotein bound to an antibody from a human survivor. Nature, 454(7201): 177～182

Madhoun MF, Fazili J, Bright BC, et al. 2010. Hepatitis C prevalence in patients with hepatocellular carcinoma without cirrhosis. Am J Med Sci, 339(2): 169～173

Silverman JL, Sharma S, Cairns TM. 2010. Fusion-deficient insertion mutants of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B adopt the trimeric postfusion conformation. Virol, 84(4): 2001～2012

Wade RC. 1997. "Flu" and structure-based drug design. Structure, 5(9): 1139～1145

Xu Y, Lou Z, Liu Y, et al. 2004. Crystal structure of severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein fusion core. J Biol Chem, 279(47): 49414～49419

撰稿人：娄智勇
清华大学

“细胞地图”的面世将造福于人类

Unraveling the Cell Atlas Will Bring Forth Tremendous Benefits for Human Beings

随着人类基因组和一系列模式生物全基因组计划的完成，生物学家意识到要更好地理解生命过程，就必须对基因的表达产物蛋白质进行结构和功能上的研究。目前，人们在细胞层面上对生命活动基本规律的了解和在分子层面上对蛋白质结构与功能的了解都已经取得了很大的进展，但是在细胞层面上对生物大分子的空间定位、结构及其相互作用还知之甚少。构筑“细胞地图”将是一种行之有效的能够把分子水平的结构和功能研究与细胞水平的生命活动衔接起来的途径。

“细胞地图”是一种描绘（或者可视化）某一特定的细胞中不同时刻所有的生物大分子的空间排布、相互作用关系的地图集。“细胞地图”可以直观地显示各蛋白质分子在细胞中栖身的场所，以及与其发生联系的朋友和伴侣，并且可以实现在一个不受干扰的细胞环境中细细地解读细胞活动的目的。这一切在过去看来似乎是天方夜谭，却随着冷冻电子显微学（cryo-electron microscopy，cryo-EM）和计算机图像处理技术的发展正在一步一步地变成现实。

细胞是一个高度动态的极其复杂而又有序的组装体。细胞作为一个个体，可以划分为不同的结构层次：细胞、细胞器、生物大分子复合物及生物大分子等。要构筑“细胞地图”就要把细胞的空间结构与分子的空间结构衔接起来。但是，长久以来由于对细胞空间结构的研究与对生物大分子空间结构的研究是运用不同的成像手段在不同的分辨率水平上获得的，细胞的空间结构与分子的空间结构不能实现对接，这样人们就不能从分子水平上构筑细胞的空间结构。而近年来迅速发展的冷冻电子显微学，适合从蛋白质分子结构到细胞和组织的空间结构的解析，恰好在细胞结构和分子结构之间搭起一座连通的桥梁，因此适宜作为构筑“细胞地图”的主要工具。

冷冻电子断层成像技术（cryo- electron tomography，cryo-ET）是冷冻电子显微学的一个重要分支，是近年来快速发展起来的在接近生理条件下研究细胞、细胞器和生物大分子复合物的三维结构的前沿技术。这项技术的工作原理是，把样品骤冷至液氮温度（使水直接变成玻璃态冰），然后通过低温透射电子显微镜收集样品的系列倾转二维投影像，经过三维重构计算得到细胞、细胞器或生物大

分子复合物等样品的三维结构。不同于传统的细胞观测技术，cryo-ET 无须染色、固定和细胞膜破碎等步骤，从而避免了产生矫作物（artifact：指非正常出现，而是由外界因素或作用所产生的一种结构或物质。如经固定后，在显微镜下才能看到的标本中的一种活生命组织中不会出现的结构）影响真实的结构。冷冻电子断层成像技术的分辨率远远高于光学显微镜的极限分辨率，目前分辨率为 4～5nm，不远的将来有望达到 2nm，从而使细胞空间结构与分子空间结构的对接成为可能。如果把 X 射线晶体学（X-ray crystallography）和磁共振技术（nuclear magnetic resonance，NMR）所获得的蛋白质分子的原子分辨率结构，锚定到较低分辨率的电子断层成像图像中，就可能在细胞水平上获得高精确的蛋白质空间定位和原子分辨率的蛋白质相互作用的结构信息。这将成为把分子水平的结构研究与细胞水平的生命活动衔接起来的可行途径。事实上，德国 Max Planck 生物化学研究所的 Wolfgang Baumeister 研究小组正致力于利用 cryo-ET 和计算机图像处理测定所有真核细胞细胞器的三维结构。

实现“细胞地图”的构筑，目前人们正在从两个方面进行工作。一方面是改善 cryo-ET 技术，包括样品准备，正如前文所提及的，科学家们正致力于使 cryo-ET 的分辨率能够达到 2nm，甚至于更高。另一个方面就是建立完善的模板库和高性能的模板匹配技术。根据已知的生物大分子结构的数据库构建模板库，从构建的模板库中寻找目标进行匹配，进而将生物大分子在 cryo-ET 得到的细胞结构中进行空间定位。由于细胞活动的可变性和蛋白质的多样性等特殊性质导致这项研究要比预想的要复杂和困难得多。首先，生命现象的发生往往是多因素影响的，必然涉及多个蛋白质。其次，多个蛋白质的参与是交织成网络的，或平行发生，或呈级联因果关系。再次，在执行生理功能时蛋白质的表现是多样的、动态的，并不像基因序列那样稳定。因此，在一个名为模板匹配的过程中，需要一个足够广泛的涵盖所有蛋白质不同状态的模板库，这样才能大大降低模板匹配过程中出现伪真实配对的几率。最终通过将冷冻电子断层扫描信号与其他参考结构相比较，准确定位出细胞中的蛋白质复合体的位置。

在未来几十年，随着技术的进一步发展，在分子水平上构筑“细胞地图”将是人类探索生命奥秘的最伟大“长征”之一。“细胞地图”这张描绘细胞中所有蛋白质的空间排布、相互作用关系的地图集，会像地理学中的 GPS 一样造福于人类。

参考文献

Baumeister W. 2005. From proteomic inventory to architecture. FEBS Lett，579：933～937

Medalia O，Weber I，Frangakis AS，et al. 2002. Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography. Sciences，298：1209～1213

Nickell S ,Kofler C , Pleis ,et al. 2006. A visual approach to proteomics. Nature Reviews ,7 :225～230

Steven AC ,Aebi U. 2003. The next ice age :cryo-electron tomography of intact cells. Trends Cell Biol ,13 :107～110

撰稿人：隋森芳　刘翠翠

清华大学

膜受体是如何跨膜传导信号的

How Do the Transmembrane Receptors Transduce Signal

作为生命活动的基本单位，细胞能够感知细胞外的不同物理或化学信号，例如光、气味、激素等，产生生理过程的一系列变化。膜受体（transmembrane receptor）是细胞感受外界的介导分子，它们定位于细胞膜上，特异识别并结合专一的生物活性物质，又称为配基（ligand）。配基和受体组成的复合物能将外界信号跨膜传递到胞内，这一过程称为膜受体的激活。膜受体激活进而启动细胞的一系列物理或化学变化，导致配基的最终生物学效应。正常与可控的膜受体激活对细胞发挥其生理功能起着重要作用，而非正常与失控的膜受体激活则能导致许多疾病的发生，如癌症等。膜受体激活中的一个关键步骤是跨膜将信号从胞外传递至胞内，它也是目前膜受体激活研究中的一个难题。对这个难题的解决不仅将从分子机制水平更好地揭示膜受体的激活过程，也将为探索治疗癌症等疾病提供指导。

已有的研究结果表明，配基与跨膜受体结合可以通过诱导受体聚合方式的改变或构象的变化来跨膜传递信号，我们可以形象地将其概括为以水平方式或垂直方式进行信号传递。采用水平方式传递信号的膜受体分子在配基结合后，在细胞膜的水平方向上产生受体的同源或异源聚合。以酪氨酸激酶受体（receptor tyrosine kinase）为例，配基结合诱导受体产生同源二聚化，其胞内激酶结构域进而在空间上互相靠近，激活自身的激酶活性。采用垂直方式传递信号的膜受体分子在配基结合后，在细胞膜的垂直方向上产生构象变化。G 蛋白偶联受体（G protein-coupled receptor）家族是通过垂直方式传递信号的典型代表。GPCR 的跨膜区由七个跨膜螺旋组成，配基与受体结合后诱导跨膜螺旋在垂直于细胞膜方向上发生相对位置的改变，这种构象的改变传递信号至细胞内并激活受体偶联的 G 蛋白。

虽然膜受体信号传递的研究取得了重要的进展，仍有许多问题需要阐明，例如：

（1）在对红细胞生成素（erythropoietin，EPO）的研究中，人们发现其受体 EPOR 在配基结合前以一种失活的同源二聚体形式存在，EPO 的结合使受体的相对位置发生改变，从而使受体二聚体从失活状态变为激活状态（图 1）。这表明在 EPOR 介导的信号传递中，受体的相对位置起了一种信号传递开关的作用。这种受体激活方式是否是一种普遍现象？在水平方式信号传递中，受体相对位置的改变除了可以开关信号传递外，是否对信号传递的效率有影响？这些都是当前

膜受体信号传递研究的难点。

（2）GPCR 是一大类七次跨膜受体家族，其所能特异识别的配基也千差万别，小到光子，大到蛋白质分子，这些大小不同的配基在 GPCR 上的结合位点会各不相同。除了通过垂直方式传递信号外，研究也表明一些 GPCR 分子，例如δ-阿片受体、多巴胺受体等，能通过配基结合诱导的受体二聚或寡聚传递信号。这些结果表明 GPCR 受体传递信号的方式比预先想象的更复杂，它们结合不同配基分子后采取的信号传递方式是另一个研究难点。

（3）膜受体激活在时间和空间上也可分为三个步骤：①配基与受体胞外结构域的特异结合；②配基和受体结合的信号通过跨膜区从胞外传递到胞内；③受体胞内结构域通过自身的酶活性或与下游效应分子的作用激活细胞内信号通路。整个膜受体激活是一个动态的过程，如何在脂双层条件下捕捉这个动态过程也是当前膜受体信号传递研究的一个难点。

膜受体信号传递的研究需要综合运用现代生物学、物理和化学技术，其中结构生物学研究方法是全面深入理解膜受体信号传递的一个重要途径。膜受体及受体配基复合物三维结构的测定能帮助我们从原子水平理解配基是如何结合并激活受体的。例如 β-肾上腺素受体（β-adrenergic receptor）和视紫红质（rhodopsin）不同状态下晶体结构的比较揭示了它们在失活和激活状态下跨膜螺旋位置的变化。膜受体三维晶体结构的测定虽然为我们提供了宝贵的信息，但它测定的只是分子的静态平均结构，因而研究膜受体信号传递的动态过程必须结合其他研究手段。目前运用的其他研究手段包括冷冻电子显微镜、多维磁共振、荧光共振能量转移（förster resonance energy transfer，FRET）、荧光光谱分析及电子顺磁共振（electron paramagnetic resonance，EPR）等。其中荧光光谱和 EPR 技术被用来研究 β-adrenergic 受体和 rhodopsin 的构象变化。进一步优化现有技术，或开发新研究技术能在脂双层状态下研究膜受体信号传递是膜受体激活研究的一个新方向。

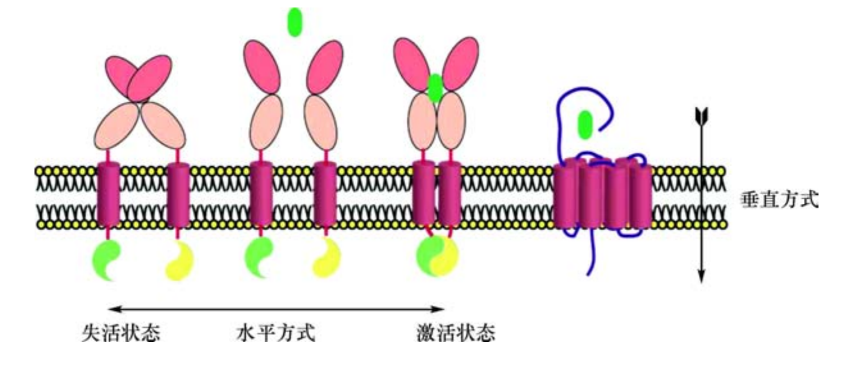


图 1　膜受体信号传递的水平方式和垂直方式

修改自 Stroud RM，et al. 2004. Sci STKE

参考文献

Cherezov V. 2007. High-resolution crystal structure of an engineered human β2-adrenergic G protein-coupled receptor. Science ,318 :1258～1265

Hanson MA. 2008. A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 Å structure of the human β2-adrenergic receptor. Structure ,16 :897～905

Livnah O. 1999. Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. Science ,283 :987～990

Lohse MJ. Dimerization in GPCR mobility and signaling. Current opinion in pharmacology 10 ,53～58

Palczewski K. 2000. Crystal structure of rhodopsin :a G protein-coupled receptor. Science ,289 : 739～745

Park JH ,Scheerer P ,Hofmann KP ,et al. 2008. Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. Nature ,454 :183～187

Rasmussen SG. 2007. Crystal structure of the human β2 adrenergic G-protein-coupled receptor. Nature ,450 :383～387

Scheerer P. 2008. Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. Nature , 455 :497～502

Stroud RM ,Wells JA. 2004. Mechanistic diversity of cytokine receptor signaling across cell membranes. Sci STKE ,231 :101～108

Warne T. 2008. Structure of a β1-adrenergic G-protein-coupled receptor. Nature ,486～491

撰稿人：王新泉
清华大学

阿尔茨海默病与蛋白质错误折叠

Alzheimer's Disease and Protein Misfolding

随着人口老龄化进程的加剧，痴呆已成为危害公共健康的主要挑战之一，给患者和家属带来了巨大的痛苦。目前全球有超过 3500 万痴呆患者，治疗及护理费用高达 3000 亿美元/年，而且患者数目在未来二十年中还将增加一倍。痴呆患者中的 50%～70% 由阿尔茨海默病（Alzheimer's disease，AD）导致。AD 又称早老性痴呆症，是一种典型的神经退行性疾病，目前尚无有效的治疗手段。德国医生 Alois Alzheimer 于 1906 年首次描述了 AD 的标志性病理特征：脑内淀粉样斑块沉积和神经原纤维缠结。然而，对 AD 致病机制的研究却直至 20 世纪 80 年代中期鉴定出相关病灶的生化组成后才得以深入。

淀粉样斑块的核心组分为 β-淀粉样肽（β-amyloid peptide，Aβ），而神经原纤维缠结则主要由过度磷酸化的微管结合蛋白 tau 聚集构成。Aβ 由淀粉样前体蛋白（amyloid precursor protein，APP）在胞内经过 β 和 γ-分泌酶的顺序加工产生（图 1）。遗传学证据显示，增加 Aβ 生成的 APP 和 γ-分泌酶核心组分 PS-1、PS-2 基因变异会导致家族性早发 AD；而与 AD 具有相似病理特征的唐氏综合征（Down's syndrome，DS）患者则具有一份额外的 APP 基因拷贝。有意思的是，目前尚未发现携带 tau 突变的 AD 病例，并且在 DS 中淀粉样沉积先于神经原纤维缠结出现，这暗示 Aβ 在 tau 之前发挥作用。

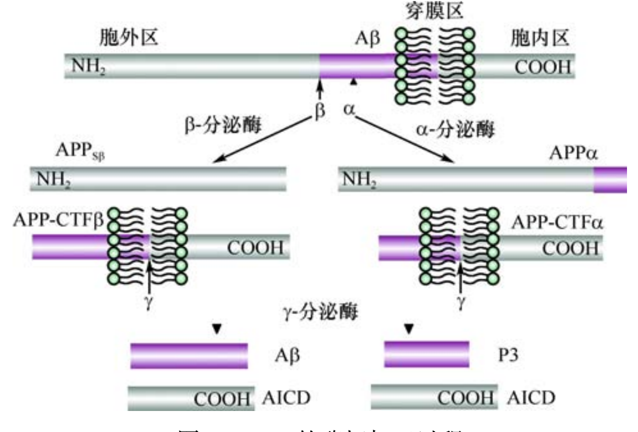


图 1　APP 的酶切加工过程

左侧为 β 加工途径，产生 Aβ；右侧为 α 加工途径，产生无害的 P3

上述发现催生了目前在该领域内占据主导地位的“淀粉样假说”（amyloid hypothesis），即 Aβ 在脑内的异常聚集是 AD 的致病主因。一般认为，Aβ 在生理条件下以可溶的单体形式存在，主要表现为无规则卷曲构象；而在病理条件下，Aβ 会错误折叠为以 β-折叠为主的构象，并进而自组装为多种形式的寡聚体和纤维，启动和促进 AD 神经病理过程。事实上，除 AD 外还有多种人类重大疾病与淀粉样病变相关，例如帕金森症、2 型糖尿病等。这些相关致病蛋白虽然在氨基酸序列、沉积位置等方面差别很大，但似乎都遵循与 Aβ 相似的错误折叠、组装及毒性机制。因此，阐明 Aβ 组装或错误折叠机制不但对于设计和改进 AD 治疗策略至关重要，而且也有助于回答与其他淀粉样聚集致病机制相关的普遍问题。

Aβ 序列中的 C 端穿膜区及其中央疏水簇（central hydrophobic cluster）是驱动其聚集的主要内在因素，而仅有 C 端两个氨基酸差别的 Aβ40 和 Aβ42 自组装行为间的显著差异，则进一步表明 Aβ 错误折叠机制对序列的依赖性。此外，Aβ 的局部浓度、微环境（缓冲体系、金属离子、氧化胁迫、小分子添加剂、振荡与否等）及糖鞘脂等配体存在与否，对 Aβ 的聚集方式影响也很大。因此，在 Aβ 错误折叠机制的研究中，首先需要在肽段合成、初始状态处理及聚集条件等关键因素上有达成共识的标准，并基于此设置必要的对照，以利于结果间的比较和印证并减少争议。

由于淀粉样斑块主要由 Aβ 纤维构成，最初的观点认为 Aβ 纤维是主要的毒性形式，但越来越多的证据显示 Aβ 纤维实际为惰性结构，其形成很可能是一种保护性机制；相反，Aβ 寡聚体才是 AD 中的关键毒性成分。Aβ 至少存在两条寡聚途径，而它们组装成惰性纤维结构的动力学和难易程度差别较大，暗示不同的错误折叠机制或寡聚途径对 Aβ 在 AD 中的作用有重要影响。Aβ 的早期变构、聚集是一个快速动态过程，因而需要具备足够时空分辨率的手段进行精细解析。除了磁共振、荧光关联、荧光共振能量转移及停流等实验方法外，随着硬件及算法改进，分子模拟在其中会扮演更加重要的角色。

解析寡聚中间体及终产物的高分辨结构，无疑对于理解 Aβ 错误折叠机制及开发特异性抑制剂都具有至关重要的意义。这首先需要鉴定和稳定制备主要毒性寡聚形式。然而 Aβ 寡聚体并非单一组成，在电泳中表现为从二聚体到二十聚体的系列组分，而已报道的主要毒性形式则包括二聚体、三聚体、十二聚体等。这些差别一方面与不同的分离及鉴定方法有关，另一方面则很可能与 Aβ 错误折叠机制或寡聚方式有关。采用标准化的寡聚体制备方法，结合构象依赖性抗体及快速分馏、固定等策略，并更多地借助磁共振波谱学、电镜结构生物学及分子模拟，或可克服此均一性问题，获得寡聚体的结构解析。

虽然目前对 Aβ 错误折叠过程及毒性寡聚体结构的理解还不够清晰，但我们

依然可能通过针对 Aβ 的产生及代谢设计出有效的治疗策略。例如，使用 β 和 γ-分泌酶抑制剂或 α-分泌酶激动剂，可通过压制 Aβ 的产生而缓解 AD 发展。虽然这些分泌酶可能还作用于多种其他生理底物，但目前已有可特异性压制 γ-分泌酶加工 APP 的抑制剂，而且至少在小鼠中敲除 β-分泌酶似乎并没有明显影响其健康状况。此外，使用 Aβ 抗体或干扰 ApoE4 代谢，可通过增加 Aβ 清除而缓解 AD 发展。虽然对 Aβ 抗体的临床疗效和副作用还有争议，但这种策略显然还有很大的改善余地。相信在不久的将来，AD 将不再是不治之症。

参考文献

孙丽文，唐孝威，胡应和. 2007. β淀粉样肽在阿尔茨海默症发病中的分子机制. 生物化学与生物物理进展，(34)：18～24

Citron M. 2010. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. Nat Rev Drug Discov, 9(5): 387～398

Glabe CG. 2008. Structural classification of toxic amyloid oligomers. J Biol Chem, 283(44): 29639～29643

Glenner GG, Wong CW. 1984. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. Biochem Biophys Res Commun, 120(3): 885～890

Hardy J, Allsop D. 1991. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. Trends Pharmacol Sci, 12(10): 383～388

Hardy J, Selkoe DJ. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. Science, 297(5580): 353～356

Hebda JA, Miranker AD. 2009. The interplay of catalysis and toxicity by amyloid intermediates on lipid bilayers: insights from type Ⅱ diabetes. Annu Rev Biophys, 38: 125～152

Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ. 1986. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci USA, 83(11): 4044～4048

Masters CL, Simms G, Weinman NA, et al. 1985. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. Proc Natl Acad Sci USA, 82(12): 4245～4249

Selkoe DJ, Podlisny MB. 2002. Deciphering the genetic basis of Alzheimer's disease. Annu Rev Genomics Hum Genet, 3: 67～99

撰稿人：吉尚戎　武　一

兰州大学

扑朔迷离的人类色素系统

Bewildering Mechanisms Underlying Human Pigmentation System

大自然是五彩缤纷的（图 1），动物个体颜色的产生可分为两种类型，结构色与生物色。结构色是生物体亚显微结构使光发生干涉或散射作用，从而显现不同的颜色，如鸟类鲜艳的羽色主要是由于光的干涉现象所引起的；而生物色则是生物体色素系统产生的色素细胞形成的，色素细胞依据白光下所呈现的颜色，可以分为黄色素细胞、红色素细胞、彩虹色素细胞、白色素细胞、黑色素细胞与蓝色素细胞。



图 1　五彩斑斓的生物

照片由福州大学生命科学研究所张西提供

人类只拥有一种色素细胞，即黑色素细胞，以此产生皮肤、毛发和眼睛的颜

色。黑色素细胞一般位于表皮的底层，即表皮与真皮的交界处，每一个黑色素细胞与周围的角质细胞一起形成一个黑色素单元。在黑色素细胞中，酪氨酸酶催化酪氨酸生成一种叫做“多巴”的物质，“多巴”与半胱氨酸反应生成黑色素（melanin）。黑色素进一步被一层膜包裹成黑色素小体（melanosome），黑色素小体由黑素细胞转运给角质细胞，从而决定了皮肤的颜色。角质细胞中黑素小体数量的多少及黑色素颗粒的表型差异导致了人类的肤色差异（图 2），这种差异很大部分是由遗传决定的。例如白种人，黑色素细胞少，而且黑色素粒子小而且散，不易晒黑；黄种人，黑色素细胞相对多，而且黑色素粒子稍大而且多，易于晒黑；黑种人，黑色素细胞多，黑色素粒子很大，肤色较深。



图 2　不同人种的肤色差异

照片由福州大学生命科学研究所陈菲提供

不难想象，黑色素的合成，黑色体的包装、转运及其分布，黑色素细胞的增殖、存活与迁移，这些生理生化代谢过程的任一环节发生功能紊乱都可能致病。事实上，科学家们已发现酪氨酸酶功能缺失将导致眼-皮肤白化症（oculocutaneous albinism，OCA1-4）的发生，在这一类型病症中，黑色素细胞完好但无法制造色素。另外，c-Kit、SCF 和 SNAI2（SLUG）基因突变被发现出现在人类斑驳病中。斑驳病的白斑常见于面部中央、前胸、腹部等身体前侧。c-Kit 是参与黑色素细胞扩增、存活及迁移的一个跨膜酪氨酸激酶受体，和其配体干细胞生长因子 SCF 一起都是脊椎动物黑色素细胞发育形成所必需的；SLUG 则编码了一个锌指转录因子，对黑色素母细胞的迁移和（或）存活是必要的。再者，在瓦登伯格综合征（Waardenburg syndrome，WS）2 型患者中发现了 Mitf 基因的突变。WS2 症表现为先天性白额（white forelock），虹膜异色和感音神经性聋。Mitf 基因编码了一种 bHLH-Zip 转录因子，用于调节一大类基因的转录，其中包括

有 c-Kit/SCF 及黑色素合成过程中的酪氨酸酶家族。Mitf 不仅在黑色素细胞发育的早期有启动作用，也在后来的黑色素细胞增殖和存活过程中起作用。

值得一提的是，2008 年日本与美国的研究人员在小鼠中发现了使毛发着色的黑色素干细胞，人类得以更为深入细致地解析了色素系统的组织结构。这些黑色素干细胞位于毛囊永久性区域的底部，这里形成了毛囊干细胞的微环境。随着毛发的生长变化，部分色素干细胞逐渐向发根底部方向移动，在毛乳头周围的“毛母基”处分化成色素细胞，释放出黑色素小体，使毛发着色。在这个基础上，研究人员继续用黑色素细胞标记的转基因鼠及人类毛发进行研究，结果表明毛发变白是由于毛囊内黑色素干细胞不能完全自我维系，干细胞库枯竭所致。虽然关于黑色素干细胞的自我调节及黑色素干细胞与微环境的相互关系尚待深入探索，但这一研究结果对于揭示人类头发变白的原因、研究因色素细胞异常引起的皮肤癌、斑驳等病变等大有帮助，同时也为开发预防白发的新药，利用移植手段治疗色素系统疾病提供了可能。

此外，人体的色素系统还受到激素的调节，如黑色素皮质素，该激素由垂体产生，此外也能以皮肤细胞的旁分泌方式产生。研究发现，在已发现参与脊椎动物色素系统调控的 100 多个基因位点中，黑色素皮质素受体 1（MC1R）一直被认为是具有代表性的位点，也是色素表型的主要决定因子。人类的 MC1R 编码区具有高度多态性，至少有 30 个等位基因异型，大部分都只引起单个氨基酸的置换。某些置换，如 R151C、R160W 及 D294H 与红色头发相关联，同时还伴随着白化的皮肤、无法晒黑且容易生雀斑等症状。

最近的研究还表明，色素系统还受到免疫系统的调控。中国和美国的研究人员运用全基因组关联分析研究（GWAS）成功发现了多个白癜风（vitiligo）易感基因。白癜风是一种常见的色素脱失性皮肤病，皮肤黑素细胞被破坏，但原因复杂，一直不明朗。新发现的易感基因 CCR6 与 FOXP1 与自身免疫反应的 T 免疫细胞、树突细胞活力调控直接相关，从而首次明确揭示了白癜风是一种自身免疫性疾病，并提供了可能的分子生物学机制，这为最终征服白癜风这种复杂疾病奠定了第一步基础。

综上所述，由色素系统功能异常引起的白癜风、斑驳症、白化症、皮肤癌黑色素肿瘤、瓦登伯格综合征等疾病，以及头发变白与少白头、老年斑与雀斑一直困扰着人类。研究还发现，色素系统不仅影响了看得见的肤色及毛发颜色，同时与此相关的基因调控网络还可能参与天然免疫反应、癌症、肥胖、糖尿病及神经退行性疾病的发生。近些年来由于技术的发展，人们得以从生化及生物物理学、分子生物学、细胞学、发育遗传学等不同层面揭示导致色素异常疾病的机制。但是，无论是复杂的多基因异常所致病如白癜风，还是黑色素细胞异常导致的色素系统疾病，都因参与调控的基因众多，且牵涉免疫系统、内分泌系统、神经系统

等多系统间复杂的交流与协调，加上缺少适合的动物模型，造成了我们深入研究并最终攻克这些疾病的障碍。

因此，怎样从系统生物学的角度分析色素系统的基因调控网络，怎样从干细胞及其微环境的角度理解黑色素系统的更新与维护，怎样从各个生理系统间的动态协调、和谐沟通与相互作用阐释色素系统的功能稳定，怎样建立更好的动物模型进行病理研究及药物筛选，都将是未来该领域的研究热点与难点。

参考文献

Jennifer YL, David EF. 2007. Melanocyte biology and skin pigmentation. Nature, 455: 843～850

Kirkpatrick M, Price T. 2008. In sight of speciation. Nature, 455: 601～602

Nishmiura EK, Granter SR, Fisher DE. 2005. Mechanisms of hair graying: incomplete melanocytes stem cell maintenance in the niche. Science, 307: 720～724

Nishmiura EK, Jordan SA, Oshmia H, et al. 2002. Dominant role of the niche in melanocyte stem cell fate determination. Nature, 416: 854～860

Prum RO, Williamson S. 2002. Reaction-diffusion models of within-feather pigmentation patterning. Proc R Soc Lond B, 269: 781～792

Quan C, Ren YQ, Xiang LH, et al. 2010. Genome-wide association study for vitiligo identifies susceptibility loci at 6q27 and the MHC. Nature Genetics, 42: 614～618

Rees JL. 2003. Genetics of hair and skin color. Annu Rev Genet, 37: 67～90

Shigeru Kondo, Hideaki Shirota. 2009. Theoretical analysis of mechanisms that generate the pigmentation pattern of animals. Seminars in Cell & Development Biology, 20: 82～89

Tachibana M. 2000. MITF: a stream flowing for pigment cells. Pigment Cell Res, 13: 230～240

撰稿人：陈　菲　乐志操　杨宇丰
福州大学

蛋白质“分子机器”是打开生命奥秘之门的钥匙

Protein Molecular Machinery Is the Key to the Understanding of Mystery of Life

蛋白质“分子机器”是以蛋白质分子为基本“元件”，由多个蛋白质分子相互作用或与其他生物大分子（如核酸）相互作用而执行特定的生物学功能的分子组装体。生命是由生物大分子相互作用、有机结合形成的“分子机器”的集合体；生物大分子“分子机器”是打开生命奥秘之门的钥匙。截至 2010 年 5 月底，蛋白质数据库（protein data bank，PDB）中收录的蛋白质结构已超过 65 000 个。毫无疑问，大量的蛋白质结构提供了理解生命现象的基石，很多生物学过程，如酶的催化机制、离子通道的通透机制、离子通道的选择性、信号转导的机制、免疫反应的机制，都在分子水平得到了解释。虽然很多生物学过程可以通过蛋白质的结构得到理解，但到目前生命现象的本质还没有从根本上得到解释。其根本原因在于，构成生命基石的蛋白质在生命体系中不是孤立存在的，几乎所有的生命过程都是通过蛋白质之间及蛋白质和其他生物大分子的相互作用而组装成的蛋白质组装体——蛋白质“分子机器”来实现的。

要想理解生命现象，不仅要理解蛋白质分子本身的结构，更要理解蛋白质“分子机器”的结构。虽然蛋白质的结构可以为我们提供蛋白质如何与其他生物大分子相互作用的信息，但是由于生命系统的复杂性，人们目前还不能仅从蛋白质结构本身准确地推断蛋白质如何与其他生物大分子相互作用；另外，当蛋白质发生相互作用时，蛋白质的结构会发生改变。因此，仅从独立测定的蛋白质结构来推断蛋白质如何发生相互作用是不可靠的。以生命体系中最重要的分子机器——蛋白质合成分子机器核糖体的结构为例，核糖体由两个亚单位构成——50S 大亚单位和 30S 小亚单位，其中大亚单位由 3000 多个核苷酸和 30 多个蛋白质构成。在核糖体的整体结构获得解析之前，构成 50S 核糖体的大部分蛋白质的结构已经独立测定。当 50S 核糖体的结构获得解析之后，科学家发现在核糖体中很多蛋白质的结构与其独立存在测定的结构不同。这是因为当蛋白质独立存在时，不与核酸发生相互作用；而在核糖体中，蛋白质与核酸发生相互作用。基于这个原因，由于解析核糖体结构而荣获 2009 年诺贝尔化学奖的 Thomas Steitz 主张对生命现象本质的理解，仅仅测定单个蛋白质分子的结构是不够的，必须测定蛋白质分子组装体——蛋白质分子机器的结构。

进入 21 世纪后，蛋白质结构的研究正向两个方向发展：①由研究单个分子向研究分子组装体——分子机器方向发展；②由离体（*in vitro*）研究向细胞在体（*in vivo*）/原位（*in situ*）研究方向发展。病毒是一种在宿主细胞内能够自我复制和繁殖的由多种蛋白质及核酸构成的最简单的生命体。根据前面的定义，病毒就是一种蛋白质“分子机器”。下面我们以病毒“分子机器”的研究为例，举例说明上述发展方向。

1. 病毒的结构

病毒是许多重大疾病如肝炎、严重急性呼吸综合征（severe acute respiratory syndrome，SARS）、艾滋病（acquired immune deficiency syndrome，AIDS）、甲型流感的病原体。要想预防和治疗由病毒引起的疾病，就必须了解病毒如何感染细胞、病毒如何繁殖及机体如何防御；而要想了解病毒如何感染细胞、病毒如何繁殖和机体如何防御，首先必须了解病毒的结构。我们最近应用冷冻电子显微镜和 X 射线晶体学相结合，解析了戊型肝炎病毒（hepatitis E virus，HEV）衣壳的三维结构（图 1）。该结构对理解戊型肝炎病毒如何装配，如何感染细胞及宿主如何对其产生免疫反应提供了基石。

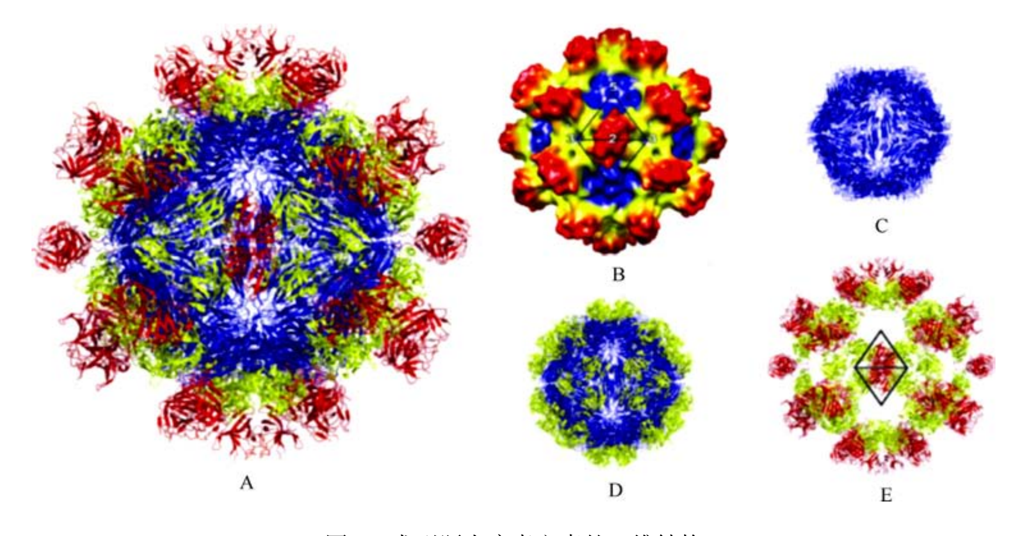


图 1 戊型肝炎病毒衣壳的三维结构

A. X 射线晶体结构（3.5Å），显示病毒衣壳为三层结构：核心层（蓝色）、中间层（黄色）和外层（红色）；B. 冷冻电镜结构（14Å），显示病毒三层结构的连接关系；C～E. 为各层的 X 射线晶体结构，显示各层的空间结构及连接关系：核心层（C）、核心层＋中间层（D）、中间层＋外层（E）

2. 病毒-受体复合物

病毒与受体的结合是病毒识别特定的细胞并感染宿主的第一步，对病毒感染机制的理解首先必须理解病毒与细胞受体的相互作用。科学家对病毒-受体复合

物进行了长期的研究，揭示了一些病毒和受体相互作用的分子机制。美国 Harvard 大学的 Harrison S 研究组应用 X 射线晶体学研究了 SARS 病毒-受体复合物的结构，揭示了 SARS 病毒与其受体的作用机制；美国 Pudue 大学的 Rossmann M 研究组则综合应用冷冻电子显微术（cryo-electron microscopy）和 X 射线晶体学对登革病毒（Dengue virus）及其受体复合物进行了长期的研究，揭示了登革病毒与其受体的作用机制。

艾滋病毒（human immunodeficiency virus，HIV）是导致获得性免疫缺陷综合征——艾滋病的罪魁祸首，为理解艾滋病毒如何感染宿主，必须首先理解艾滋病毒如何与其受体发生相互作用。科学家最近应用近年来发展的冷冻电子层析技术（cryo-electron tomography），对 HIV 及其受体 CD4 复合体的结构进行了研究，揭示了 HIV 与受体 CD4 的作用机制。美国 Florida 州立大学的 Roux K 研究组应用冷冻电子层析方法研究了 HIV 病毒表面与受体发生相互作用的“棘”（spike）的结构及其分布；美国 NIH 的 Subramaniam S 研究组则应用冷冻电子层析方法研究了 HIV 病毒表面与受体发生相互作用的“棘”的结构及其与受体 CD4 的相互作用，揭示了 HIV 病毒与受体的作用机制。

流感病毒（influenza virus）是导致传染性流行性感冒的罪魁祸首，2008 年开始流行，2009 年暴发的流感就是由一种甲型（H1N1）流感病毒引起的流感。为理解流感病毒如何感染宿主，以便有效地预防和治疗由流感病毒引起的流感，必须首先理解流感病毒的结构。美国 NIH 的 Steven A 研究组应用冷冻电子层析方法研究了一种甲型流感病毒（H3N2）的结构，建立了流感病毒的结构模型。

X 射线晶体学和 NMR 可提供生物大分子高分辨结构，冷冻电子显微术能提供生物大分子组装体的整体结构。近年来出现了一种新的研究蛋白质“分子机器”的策略，即用 X 射线晶体学和 NMR 解析蛋白质“分子机器”每个“元件”的高分辨结构，同时用冷冻电子显微术获得蛋白质“分子机器”的整体结构，然后应用计算机算法把高分辨“元件”的结构“对接”（docking）到用冷冻电子显微术获得的蛋白质“分子机器”整体结构之中，从而不仅可以获得蛋白质“分子机器”的整体高分辨结构，还可分析在蛋白质“分子机器”中“元件”之间如何相互作用，阐明蛋白质“分子机器”如何“运转”。这一途径称为“整合结构生物学”（integrated structural biology）。“整合结构生物学”已成为研究蛋白质“分子机器”的有力研究手段，越来越多的重要生命现象/重大疾病相关的蛋白质“分子机器”的结构通过“整合结构生物学”破解或正在破解，如前面介绍的戊型肝炎病毒、SARS 病毒-受体复合体、HIV 病毒、流感病毒等。

参考文献

Ban N，Nissen P，Hansen J，et al. 2000. The complete atomic structure of the large ribosomal

subunit at 2.4Å resolution. Science,289:905～920

Guu TS, Liu Z, Ye Q,et al. 2009. Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. Proc Natl Acad Sci USA,106:12992～12997

Harris A, Cardone G, Winkler DC,et al. 2006. Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. Proc Natl Acad Sci USA,103:19123～19127

Li F, Li W, Farzan M, et al. 2005. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. Science,309:1864～1868

Liu J, Bartesaghi A, Borgnia MJ,et al. 2008. Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers. Nature,455:109～113

Pokidysheva E, Zhang Y, Battisti AJ,et al. 2006. Cryo-EM reconstruction of dengue virus in complex with the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN. Cell,124:485～493

Steven AC, Baumeister W. 2008. The future is hybrid. J Struct Biol, 163:186～195

Zhu P, Liu J, Bess J Jr,et al. 2006. Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. Nature,441:847～852

撰稿人：尹长城

北京大学

控制干细胞定向分化的核心机制是什么

What Is the Key Mechanism of Stem Cell Differentiation

干细胞是一类具有自我复制、高度增殖和多向分化的潜能，被认为是人体内所有细胞、组织和器官的“种子”和“根源”的“万能”细胞。由于干细胞在再生医学上具有无可估计的应用价值（图 1），因此干细胞的相关研究一直吸引着国际上生物与医学各领域科学家。

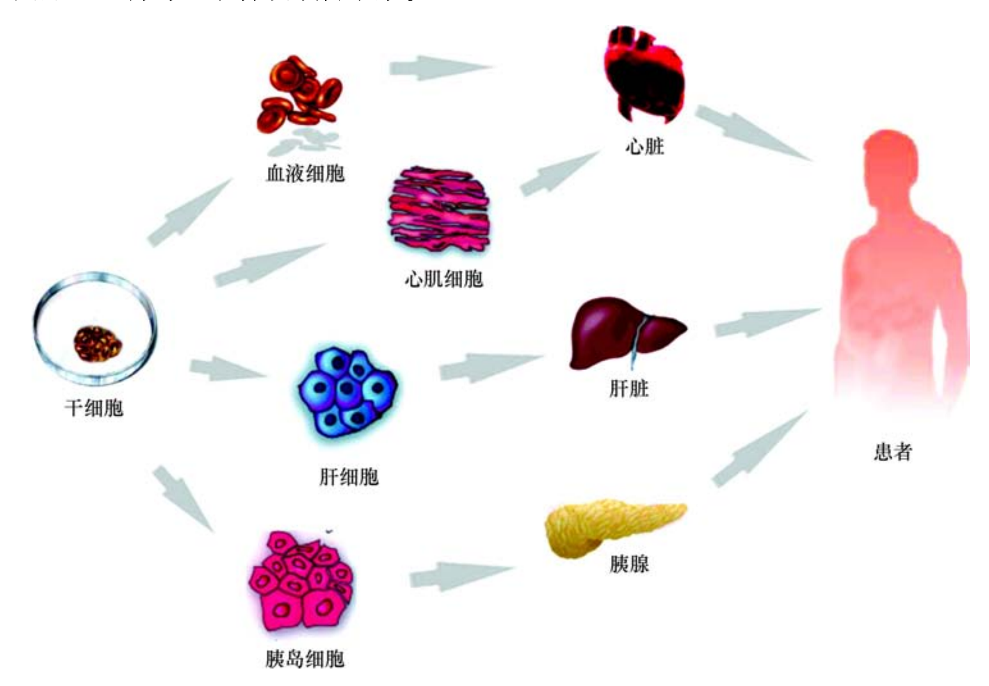


图 1　干细胞用于心脏病、肝病和糖尿病等疾病治疗

长期以来，制约干细胞在临床上大规模应用的主要瓶颈有：①干细胞的来源；②干细胞定向分化为预期细胞或组织的效率；③移植后的干细胞和分化细胞的安全性。1998 年，美国 Thomson 实验室率先从人类胚胎中分离培养出多能性干细胞，但由于人类胚胎干细胞分离在道德方面的争议使相关胚胎干细胞的研究相对滞后。直到最近，日本 Yamanaka 实验室获得由体细胞重编程而来的“类 ES 干细胞”的诱导性多能干细胞（iPS 细胞）为人类大规模获得“无争议”的

干细胞和应用的设想提供了一条可行的思路。这一瓶颈的突破后，世界各国的研究机构和许多知名的大制药公司也纷纷在干细胞研究方面投入了大量的人力和资金，以期占领干细胞技术和相关产业的制高点。

目前尽管通过在体细胞中过表达不同转录因子的方法来获得 iPS 细胞克隆的效率非常低，但相信随着相关研究的不断推进，这一问题终将获得解决。而如何将干细胞高效定向分化为具有功能的成熟细胞和组织器官才是干细胞走向临床的关键。能否解决这一问题将直接决定人类最终能否突现“像汽车更换零件一样更换自己体内病变或者衰老的器官”这一梦想。

实际上，仅从遗传物质 DNA 的水平上来讲，干细胞与分化的细胞或各种组织器官无任何区别。所以，要解决干细胞定向分化的效率这个问题，我们就必须从控制遗传物质发挥功能的更高一级的“管理模式”——表观遗传和转录因子下手。那么，什么是表观遗传呢？简单地讲，表观遗传就是在遗传物质 DNA 水平之上的控制基因表达与不表达的一种可遗传的基因调控的模式。它虽然不改变 DNA 的序列，但可以调节 DNA 的修饰（如 DNA 甲基化修饰）和 DNA 所缠绕的组蛋白的不同修饰（又称表观遗传修饰），进而改变基因的“染色质高级结构”来达到控制基因“行为”的目的。在干细胞分化过程中，正是那些控制表观遗传修饰的蛋白质和转录因子决定了干细胞分化相关的基因表达与否。

目前已鉴定出的表观遗传调控因子大体可分为四类：①染色质修饰酶，包括组蛋白或 DNA 修饰调控的各类酶；②染色质结合蛋白，它们可以特异性识别各类表观遗传修饰，并参与染色质高级结构的调控；③染色质重塑蛋白，是一类通过消耗 ATP 移动核小体在 DNA 链上的位置，进而调控染色质动态结构的蛋白质；④组蛋白分子伴侣，这类蛋白质主要通过“分子伴侣”功能催化辅助组蛋白在染色质中的掺入，调控核小体的功能。这些表观遗传因子相互之间“交叉会话”，并与各种以 DNA 结合蛋白为代表的遗传因子一起构成了一个复杂的分子调控网络，在细胞的分化、增殖和组织器官的发育等过程中发挥了关键作用。因此，弄清调控干细胞定向分化过程中涉及的表观遗传修饰的关键蛋白及复合物、研究其结构和功能的关联与调控机制，建立起高效和稳定的干细胞体外定向分化技术体系是干细胞用于临床治疗的必要步骤。

虽然参与表观遗传调控的蛋白质非常多，涉及表观遗传模式的建立、继承、重塑等，但其核心是控制染色质高级结构的变化，目的是造就一种“开放”或是“不开放”的结构。那些可以激活基因表达的、具有组织特异性的转录因子要么可以结合基因的启动子要么不结合，进而决定基因是表达还是不表达，最终决定了干细胞向哪种细胞或组织定向分化的命运。所以，我们如果希望在干细胞的定向分化及再生医学上有所突破，我们将有必要弄清究竟是哪些关键的因子决定了不同染色质结构状态的“有序”转换。2009 年 8 月，《Nature》上一篇对小鼠胚

胎细胞中的调控因子所做的一项工作的文章表明，染色质高级结构的转换对干细胞分化命运十分重要。这一研究进一步支持了“染色质转换”理论的有效性。总之，表观遗传修饰因子及其调控的染色质结构变化在干细胞定向分化中发挥着重要的调节作用。研究参与染色质结构和基因转录的“粗调”因子与“微调”因子的功能与机制是干细胞定向分化和再生医学研究的重要方向之一。

干细胞研究与结构生物学和化学生物学的结合是发展的趋势。利用结构生物学的手段对控制干细胞定向分化和组织器官形成的关键表观遗传因子的蛋白三维结构解析将有利于弄清这些蛋白质在三维结构的水平上如何发挥作用、作用的关键位点在哪？根据蛋白质作用的位点，我们可以结合化学生物学的手段进一步设计小分子化合物，进而“人为地”来调节这些蛋白质的作用“模式”，最终达到用药物来控制干细胞定向分化的目的。当然，最重要的是我们首先要弄明白哪些因子是必需的。

将干细胞定向分化为具有功能的组织细胞仅仅是“长征”的第一步，要让这些细胞最终形成像体内一样的功能组织还需要做大量的工作。我们到现在依然对细胞形状如何控制的机制了解得较少，对组织器官体积大小是如何控制的也知之甚少……至少从目前来看，干细胞在体外分化与组织器官的重建也将需要一些特殊、安全的合成材料来协助完成体外“重建”工作。虽然我们面对的问题还很多，但可以相信这一天最终会到来的。

参 考 文 献

Hemberger MD，Reik W. 2009. Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment：digging Waddington's canal. Nat Rev Mol Cell Biol，10：526～37

Horton RE，Millman JR，Colton CK. 2009. Engineering microenvironments for embryonic stem cell differentiation to cardiomyocytes. Regen Med，4(5)：721～732

Shinichiro Ogawa，Shinichi Miyagawa. 2009. Potentials of regenerative medicine for liver disease. Surg Today，39：1019～1025

Sterthaus O，Zhang H，De Geyter C. 2009. Embryonic stem cells-a scientific by-product of the assisted reproduction technology? Ther Umsch，66 (12)：839～845

Takahashi K，Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell，126(4)：663～676

Williams CA，Lavik EB. 2009. Engineering the CNS stem cell microenvironment. Regen Med，4(6)：865～877

撰稿人：孙方霖　王大亮

清华大学

环境胁迫如何影响人类的健康

Environmental Stresses Affect Human Health：How Does It Work

何谓环境胁迫？这一名词中的“环境”大体上可以分为自然生态环境、人文和社会环境。气候、温度、水源质量、空气质量等属于自然生态环境的范围；生活和工作压力、心理健康状况、各种辐射、环境与噪音污染等则属社会环境的一部分。这些环境因素对生物个体的生长发育、寿命和繁殖等造成的压力影响就是环境胁迫（图 1）。

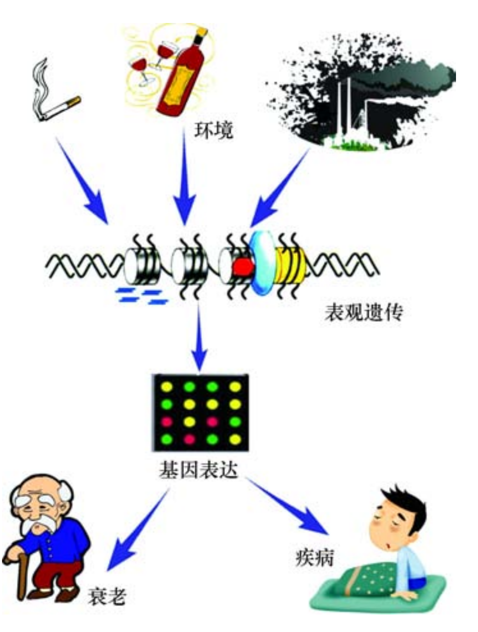


图 1 环境通过表观遗传调控影响人类健康和衰老

人类生存环境的性质及演变与疾病密切相关。达尔文早在 1859 年出版的《物种起源》中用大量资料证明了形形色色的生物都不是上帝创造的，而是经由遗传、变异、生存斗争和自然选择，由简单到复杂，由低等到高等，不断发展变化的，并提出了自然选择学说。该学说讲述的“自然选择”或称为“物竞天择、适者生存”，实际上就是生物在面对不同或变化的生活环境的压力胁迫时所采取的应对方式。现实的例子更是举不胜举，譬如区域性的“地方病”。20 世纪 70 年代以来被列为我国重点防治的地方病主要有克山病、大骨节病、碘缺乏病等。这些疾病发病地区的人群在迁移到其他地区之后，发病状况、病情状况和病程都可能会有所不同。套用中国的一句老话，“一方水土养育一方人”。南方人较北方人瘦小，高原地区居民皮肤较平原地区人黑，这些都在提示自然环境、文化和社会环境与物种发育、进化相关联。实际上，人类从父母获得性遗传或“家系遗传”导致的疾病仅占极少数。目前人们已经普遍接受了一个观点，即环境中的化学物质和其他因素能够间接影响人类本身的遗传物质或基因组的功能而导致疾病的发生和寿命的改变。

环境胁迫是如何影响基因组功能而导致发育异常或引起疾病发生的呢？对这

些问题的完整回答将依赖于近些年发展较快的新学科——表观遗传学（epigenetics）的研究进展。按照英文字面解释，表观遗传是位于遗传物质 DNA 上游并控制遗传物质功能的调控模式。这一概念是沃丁顿（Waddington）于 1942 年在《Endeavour》杂志上第一次提出的。表现遗传学是研究生物表观遗传变异（epigenetic variation）现象的一门遗传学分支学科。其定义为：非基因序列改变所导致或维持基因表达水平或功能变化的可遗传的基因调控 DNA 的甲基化、组蛋白的不同修饰及染色质构象变化等都是表观遗传调控的重要因素。这些表观遗传调控因素的变化，虽然并不影响 DNA 的序列，但可直接改变基因表达的模式。举个例子，如果一个正常表达的“抑癌”基因发生了表观遗传调控的变化使该基因“不表达”，尽管其 DNA 序列没有发生突变，但其后果与该基因发生突变而失去功能是一样的。已有的科学研究和流行病学调查发现，一些环境和饮食因素（如吸烟、饮酒、叶酸缺乏等）的确能够引起人体表观遗传通路的异常改变，影响胎儿的发育、组织器官的功能及引起病变等。

在一些常见、多发的良性疾病如高血压、糖尿病，以及良、恶性肿瘤中，研究人员也都发现表观遗传通路的畸变。事实上，在肿瘤发生、发展的每一个阶段中都可以检测到表观遗传调控的改变（如乳腺癌和前列腺癌等）。科学家预测在 2 型糖尿病、肥胖和不孕不育等疾病中，表观遗传调控也发挥着重要的作用。非正常的表观遗传调控的改变，往往伴随着染色体的稳定性改变和染色体重组，进而导致染色体的缺失和区域性移位等“染色体突变事件”。与基因突变不同的是，表观遗传调控具有“可逆性”，也就是说，如果我们能在早期发现某些重要的非正常“表观遗传调控”的改变，就有可能根据其具体的变化设计一条基于表观遗传改变的治疗方案，用于肿瘤的早期防治。目前，临床医学的研究人员正在努力寻找能够作为肿瘤早期临床诊断和治疗效果预后评价的“表观遗传”指标。

除了疾病以外，人类的衰老和学习记忆能力也已经被证实有表观遗传的参与。如果我们能够弄清表观遗传参与学习记忆以及衰老调控的网络，也许能够通过表观遗传学方法使人类的寿命大大地延长，人类会变得更聪明。

目前，虽然我们对环境与人类的发育、疾病的关联性有了一定的认知，但对这些不同的环境因素所导致的具体表观遗传改变我们了解的却并不多。以后相关研究的重点将主要涉及：

（1）不同的环境因素导致哪些具体表观遗传调控模式的改变？这一工作的开展需要结合流行病学调查，根据发病的区域性和其他环境特点，结合表观遗传学研究的手段开展相关研究。

（2）弄清不同的表观遗传改变导致问题的分子机制。在结合基础研究的基础上，弄清特定的表观遗传改变都导致哪些基因的表达发生改变，是否导致染色体的缺失和基因的突变等。

(3) 根据表观遗传“可塑性”的特点，研发可抑制或“纠正”非正常表观遗传改变的相关药物。

总体来讲，随着表观遗传学的发展、分子生物学及其他学科研究手段的不断革新，我们有必要开展“从环境—人群—器官/细胞—染色体—基因”等不同层次和水平上筛选和确定环境胁迫造成的疾病发生的机制，弄清其生物学标志，便于疾病的防治。另外，掌握了这些“环境污染”因素的致病机制也将有助于国家在环境维护和食品安全等方面的立法工作。从人类生存的环境中去除这些污染源、维护人类的健康才是我们的最终目标。

参 考 文 献

周宗科，沈彬．2009．壤塘县藏区成人大骨节病多个大关节受累与分度的关系研究．中国骨与关节外科，2 (5)：352～356

Allis Jenuwein. 2009. 表观遗传学．朱冰、孙方霖编译．北京：科学出版社

Barros SP, Offenbacher S. 2009. Epigenetics: connecting environment and genotype to phenotype and disease. J Dent Res, 88 (5): 400～408

Belpomme D, Irigaray P. 2009. Prostate cancer as an environmental disease: an ecological study in the French Caribbean islands. Martinique and Guadeloupe. International Journal of Oncology, 34: 1037～1044

Dworkin AM, Huang TH. 2009. Epigenetic alterations in the breast: implications for breast cancer detection, prognosis and treatment. Semin Cancer Biol, 19(3): 165～171

Hall JG. 2010. Review and hypothesis: syndromes with severe intrauterine growth restriction and very short stature—are they related to the epigenetic mechanism (s) of fetal survival involved in the developmental origins of adult health and disease? Am J Med Genet A, 152A (2): 512～527

Irigaray P, Belpomme D. 2010. Basic properties and molecular mechanisms of exogenous chemical carcinogens. Carcinogenesis, 31(2): 135～148

Turner BM. 2009. Epigenetic responses to environmental change and their evolutionary implications. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 364 (1534): 3403～3418

撰稿人：孙方霖　刘　岩

清华大学

细胞中的染色体如何维持自己的特性

How Chromosomes Maintain Their Characteristics Within the Cells

“龙生龙，凤生凤，老鼠的儿子会打洞。”这句俗语形象地表明，很早我们就认识到不同的物种，包括人类，能够将各自的物种特性一代代传递下去。尽管不同物种的遗传物质组成可能千差万别，组成物种个体的细胞数目可能有很大不同，但各自的特性能得以遗传。这归功于细胞中的染色体能够在细胞周期中很好地维持自己的特性。

染色体是细胞中具有遗传性质的物体。每条染色体是一个线性的完整的DNA双链分子，加上结合在上面的组蛋白（呈碱性，富含赖氨酸和精氨酸）和非组蛋白（如DNA解旋酶）等。染色体容易被碱性染料着色，最早由德国生物学家Flemming在1878年用染料对细胞处理时发现。1928年，美国科学家Morgan通过果蝇的研究，发现染色体是遗传物质基因的载体，从而开辟了染色体遗传学学科。1953年，DNA双螺旋结构的发现为遗传物质的稳定遗传提供了分子结构上的诠释。染色体和染色质实际上是同一种物体在细胞不同周期的不同表现形式。染色体是紧密的，染色质是松散的。染色体是染色质高度螺旋化紧密折叠后形成的。这样的一个折叠—解构—再折叠的过程是可逆的，但同时也是高度复杂的一个过程。以人类为例，一个细胞内的DNA约含60（=30×2）亿对碱基，若以B型DNA双螺旋构象（螺距为0.34nm/碱基对）来估算，DNA总长度约2m，而细胞的直径只有2μm左右。问题是：细胞是怎样在自身极端狭小的空间内，将这样长度的DNA有效包装起来又拆解开，反复进行，又不影响细胞周期的正常功能呢？

DNA双螺旋(2nm)
↓
核小体(10nm)
↓
核小体组装的染色质丝(30nm)
↓
染色质丝的螺旋(600nm)
↓
染色体(1000nm)

图1　染色体的多级组装模式

染色体的折叠是一个多级的过程。建立在DNA双螺旋结构上的核小体是染色体组装的基石。每个核小体包括8个分子的组蛋白，外面缠绕着146个碱基对。相邻核小体之间有DNA相连接。核小体再进一步组装起来，从而形成30nm粗的染色质丝。在细胞分裂期间，染色质丝进一步紧密压缩，形成尺度在微米级的染色体。在细胞分裂结束后，染色体又松散为染色质，等待在下一个细胞周期中再次折叠压缩（图1）。

仅仅在尺度上来理解染色体的组装折叠是远远不够

的。在细胞分裂世代中，染色体要维持稳定，必须做到可以自我完整复制及遗传物质在子代细胞中的均匀分配。稳定性直观地体现在细胞分裂前后，染色体个数一致，而且在结构和架构上保持特性。染色体特性的维持需要三个要素的存在。首先，染色体上存在 DNA 复制起始点，使得染色体在细胞周期中能够主动完成自我复制。其次，染色体上存在着丝粒，可以与细胞分裂期的纺锤丝结合，在分裂后期着丝粒一分为二，附着在着色粒上的遗传物质也一分为二，从而保证了遗传物质的均匀分配。最后，染色体的末端存在端粒序列，是高度重复的一段短序列。科学家起初发现染色体内部的断裂很容易修复，但是不同染色体的末端却很难连接到一处，由此推测末端存在一些特殊序列。后来通过美国科学家 Blackburn 等的努力，发现了端粒序列及端粒酶。端粒酶的存在使得染色体末端序列不会因为细胞周期中 DNA 的复制而缩短。端粒和端粒酶的相互作用使得染色体在细胞世代中保持稳定。

染色体复制起始点方面的研究发现，不同的老鼠胚胎干细胞或诱导全能型细胞在染色体上的复制起始时序基本相同。但一旦分化为神经前体细胞，复制起始点就发生很大变化，甚至在 20% 的染色体区域发生改变。同样的现象也在不同的果蝇细胞和人体细胞中观察到。这说明细胞发育过程中在染色体架构上有变化，导致复制起始点发生相应的改变。研究表明，染色体复制起始点有很大的可塑性，那么细胞是怎样做到染色质折叠和解构过程中精确控制复制起始点的呢？在序列上及结构上有什么特殊性吗？第一个复制起始点在何处，序列或结构怎样？

着丝粒方面的研究表明，细胞分裂过程中纺锤丝的特异性识别并不依赖于着丝粒的序列。实际上，着丝粒的序列由于其多变性和高度重复性，占未完成的人类基因组测序中很大一部分。着丝粒可能是通过表观遗传的方式来实现功能。参与表观调控是一个称为着丝粒蛋白 A（centromere protein A）的组蛋白变体。这个有趣的现象说明细胞染色体在细胞周期中的稳定维持不仅仅是 DNA 的作用，也有蛋白质在发挥功能。

端粒方面的工作因为 2009 年诺贝尔生理学/医学奖而引人关注。该年度本奖项得主 Blackburn、Greider 和 Szostak 对端粒、端粒序列和端粒酶做了深入的研究，揭示了端粒与衰老和癌症的关系。他们的研究发现，癌细胞往往有很强的端粒酶活性，因此怎样抑制端粒酶活性而不影响染色体正常功能就成为很有吸引力的癌症治疗手段。

通过化学交联和 DNA 测序的方法，现在已经能够将同一个染色体上或不同染色体上空间接近的 DNA 序列进行确定。通过这样的研究手段，发现人类染色质可能压缩成一种没有打结的构象，这样可以很方便地在任何基因位点序列上压缩或伸展开。类似的方法应用在酵母细胞的研究上，科学家们得以构建酵母染色

质的三维结构，分辨率达到千碱基对。这样的三维结构为我们了解染色质的折叠提供了起始模型，但是三维结构的分辨率还需要进一步提高。

随着人类基因组测序计划的完成，现在已经进入了后基因组时代。人类基因组序列中还有很多区域的功能不甚明了。这些功能未知区域可能隐含着人类健康与疾病的密码，或者提供了一种基因表达编程的可塑性，或者与染色体在细胞周期中某些作用相关。因此，有必要建立一种易于染色体工程操作的体系，方便研究不同染色体区域在细胞周期中的作用及对染色体折叠的影响。我们对这一过程中蛋白质调控机制的了解也远远不够，在 DNA 复制起始点、着丝粒和端粒等的结构与功能方面研究也很有限。对染色体在细胞周期中作用机制的深入了解，将打开一个全新的领域，为更好地诊治各种遗传性疾病提供实验支持和科学依据。

参考文献

Duan Z, Andronescu M, Schutz K, et al. 2010. A three-dimensional model of the yeast genome. Nature, 465(7296)

Lieberman-Aiden E, van Berkum NL, Lander ES, et al. 2009. Comprehensive mapping of long range interactions reveals folding principles of the human genome. Science, 326(5950): 289～293

Zeitlin SG. 2010. Centremeres: the wild west of the post genomic age. Epigenetics, 5(1): 34～40

撰稿人：陈　荣

中国科学院上海巴斯德研究所

细胞如何进行重编程

How Are Cells Reprogrammed

各种体细胞都是由胚胎干细胞（embryonic stem cell，ES 细胞）发育而来，但是终末分化的细胞不再具有分化成其他类型体细胞的能力。如何获得具有多向分化潜能的细胞用于研究胚胎发育机制以及临床疾病的治疗呢？胚胎干细胞是一个很好的来源。1989 年，Thomson JM 等建立了第一株人类胚胎干细胞系，为人类遗传病、退行性疾病、肿瘤等重大疾病的治疗开启了曙光。但是，不管是自然的胚胎还是通过体细胞核移植技术克隆胚胎以获得胚胎干细胞都面临两个制约因素：一是细胞移植后的免疫排斥；二是破坏胚胎的伦理学限制。如何突破或者绕过这两个限制呢？这一直是从事干细胞研究的科学家们在苦思冥想和努力探索的问题。要避开从胚胎来源获得胚胎干细胞，只能将目光聚集在体细胞上！那么终末分化的体细胞能否恢复到具有多向分化潜能的胚胎细胞阶段或状态呢？在自然发育的过程中这是不可能的。必须对体细胞“做手脚”——改造和逆转体细胞，使其“重编程”，重新获得多向分化潜能，具有等于或类似于胚胎干细胞的特性。重编程意味着部分改变体细胞基因程序，重新激活蕴藏在体细胞核内的多能性机制。那么如何将体细胞重编程逆转为多能的干细胞呢？这一问题已困扰科学家很多年。

目前科学家们已发展了多种获得具有类似 ES 细胞多向分化潜能特性的多能干细胞的方法：体细胞核移植（somatic cell nuclear transfer，SCNT）、体细胞与 ES 细胞融合、利用 ES 细胞提取物与体细胞共孵育、染色质的表观遗传学修饰等。而 2006 年以来发展的转录因子诱导方法使这一领域发生了革命性的变化。

体细胞重编程需要重新启动哪些“程序”，即哪些基因或蛋白质可以维持细胞的多向分化潜能呢？在胚胎干细胞、体细胞核移植的研究和应用过程中发现了许多因素可以使体细胞重编程：DNA 分子和组蛋白的表观遗传学修饰可以使染色质重塑，维持胚胎干细胞多能性的转录因子如 Oct-4、Nanog 等可以被激活。其中 Oct-4 被认为是细胞全能性的标志，Oct-4 的活化被认为是重编程细胞具有多能性的标志。

胚胎干细胞的基本特性包括多向分化潜能和增殖能力。包括上述转录因子在内的许多因子可以从以上两个方面满足体细胞向多能干细胞转化所需的条件。2006 年，日本科学家 Takahashi 和 Yamanaka 等使用逆转录病毒载体，将四种转

录因子的基因（Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4）导入小鼠皮肤成纤维细胞中，发现细胞最终具有了类似胚胎干细胞的特性，因而被称为“诱导性多能干细胞”（induced pluripotent stem cell，iPS）。实验证明，iPS 细胞特性几乎和 ES 细胞一样，表达 ES 细胞的各种表面标记，可以分化为各种组织细胞。由此诱导体细胞为 iPS 细胞成为细胞重编程领域研究的热点。2007 年 11 月，Takahashi 等使用 Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 四种转录因子，Yu 等使用 Oct-4、Sox2、Nanog 和 Lin28 四种转录因子分别成功地将人类的成纤维细胞诱导成了 iPS 细胞，使得将 iPS 细胞用于临床治疗的可能性又向前迈进了一步。2008 年 4 月，Hanna 等在加入了 CCAAT/增强子结合蛋白（C/EBPα）的情况下，利用逆转录病毒将 Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 四种基因导入成熟的小鼠 B 细胞中，将其重编程成为 iPS 细胞，进一步排除了 iPS 细胞来源于未分化细胞的可能性。

由上述研究可见，iPS 细胞系的建立包括以下几个关键步骤和环节（图 1）：①分离和培养宿主细胞；②通过病毒（逆转录病毒、慢病毒或腺病毒）介导的方式将外源基因导入宿主细胞；③将病毒感染后的细胞种植于饲养层细胞上，并加入 ES 细胞专用培养体系（含有相应的促进重编程的小分子物质如 Wnt3a、5-AZA、VPA、TSA 等）；④细胞克隆鉴定，包括细胞形态、基因表达谱、表观遗传学、畸胎瘤形成和体外分化能力等方面的鉴定。在宿主细胞的选择上，不同胚层来源、不同发育阶段的细胞都可以被重编程，但成体干细胞更容易被诱导重

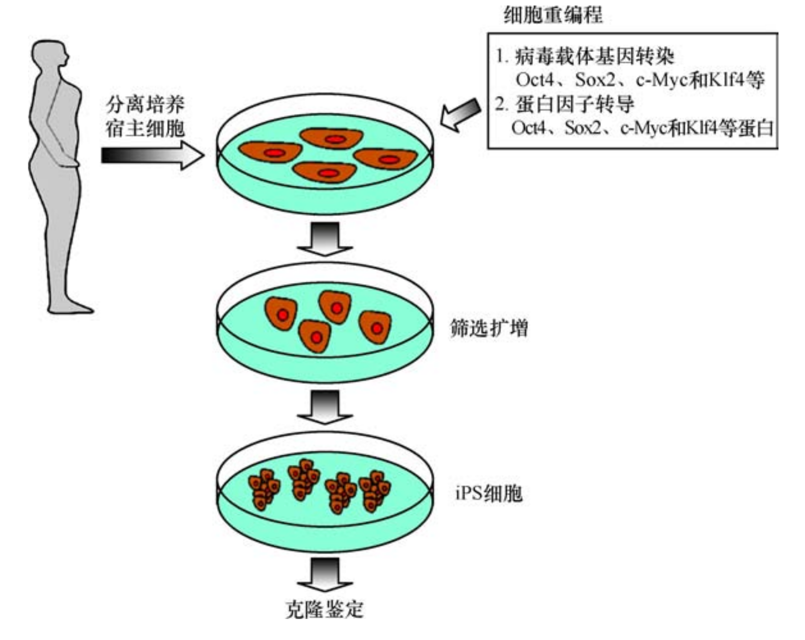


图 1　获得人类 iPS 细胞的基本方案

编程。体细胞种类及转录因子组合的不同只是诱导 iPS 细胞克隆形成的效率和时间不同，在某些影响转录因子活性、影响染色质表观遗传学特性的小分子物质及特异性的 microRNA 作用下，可以显著提高重编程的效率。

iPS 细胞技术的问世为建立疾病特异性的或患者特异性的人 iPS 细胞，实现个体化治疗奠定了良好的基础。iPS 细胞研究成果一经报道，科学家们迅速将其进行了医学领域的尝试。2007 年 12 月，美国 Whitehead 研究所的 Hanna 等利用人类镰状细胞贫血模型小鼠的皮肤成纤维细胞，通过将 Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 基因导入，诱导获得自体 iPS 细胞，并应用基因特异打靶技术对 iPS 细胞的人类镰状血红蛋白等位基因进行纠正，进一步诱导为造血干细胞，移植入病鼠体内成功治疗了镰状细胞贫血（图 2）。Wernig 等将 iPS 细胞诱导分化为多巴胺能神经元，植入帕金森模型小鼠的纹状体后能改善症状。

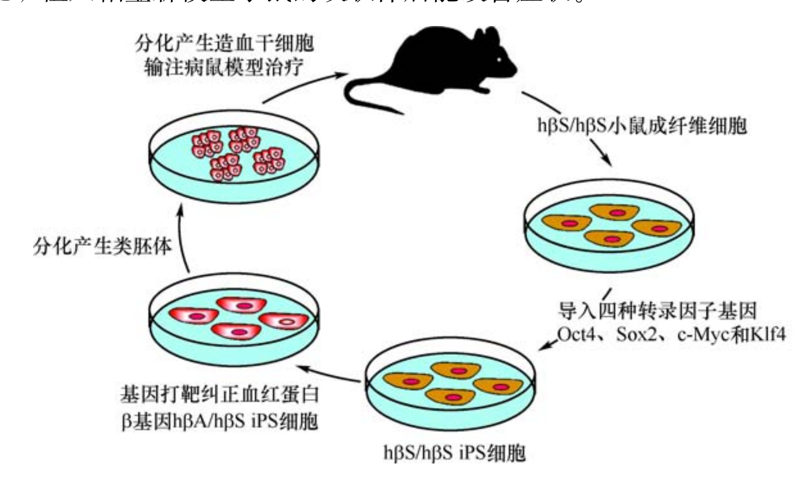


图 2　体外应用特定转录因子联合基因重编程皮肤成纤维细胞治疗小鼠镰状细胞贫血的研究方案

但是，必须看到，iPS 细胞的研究和应用仍然存在一些需要克服的问题。

1. 病毒整合基因组

诱导 iPS 产生的关键步骤是应用病毒作为载体传递外源基因，最常用的逆转录病毒携带外源基因可以直接整合进宿主的基因组，进而可能激活癌基因。即使非整合病毒如腺病毒载体，也存在激活内源癌基因的可能性。如何解决这一问题呢？目前正在研究和发展的可供选择的技术包括以下几种：①非病毒载体，如表达质粒、化学因子（小分子物质）等；②直接导入转录因子蛋白（图 1）；③从转染细胞中移除病毒载体，即已经获得的经病毒载体诱导的 iPS 细胞经诱导分化为特定细胞后，在应用之前从细胞中去除病毒载体。即使上述方法可以避免宿主细胞被病毒整合的问题，但是所获得的目的细胞仍然存在遗传或表型的改变。因

此上述方法仍然还存在一些不够完善的地方，需要进一步提高重编程效率。另外iPS 细胞的来源细胞仍然还存在原来成体细胞的遗传和表观记忆，不是完全意义上的 ES 细胞。

2. iPS 细胞成瘤的风险

和 ES 细胞一样，iPS 细胞也存在成瘤性，在体外需要进行筛选，获得不具有染色体异常和遗传表型改变的 iPS 细胞。在体外诱导分化后需要将未分化的iPS 细胞去除以避免体内成瘤。可以通过流式细胞术（FACS）筛选或抗体细胞毒作用将未分化 iPS 细胞去除掉。

3. 建立有效的诱导 iPS 分化的方案或策略

iPS 细胞是否能够产生有功能和正确表型并具有一定数量的分化细胞是非常重要的问题。实验已经显示一些 iPS 细胞的分化能力是下降的。另外一个问题是，由于 iPS 细胞来源于成体细胞，可能存在一些成体细胞的隐性突变积累。分离鉴定正常的成体细胞或应用个体的冷冻脐血来源细胞可能使这一问题得以解决。因此要将 iPS 细胞应用于临床治疗，必须建立标准的诱导分化和筛选方案以提高 iPS 应用治疗的标准和效果。

尽管获得安全、高效、具有临床应用价值的 iPS 细胞还有许多亟待解决的问题，但随着人类对干细胞分化调控机制认识的不断深入，利用重编程技术获得iPS 细胞诱导产生更多种类的人类细胞，将为人类胚胎发育机制研究、细胞替代治疗、新药筛选与评价等领域开辟更加广阔的前景。

参 考 文 献

Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, et al. 2008. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. Cell, 133(2): 250～264

Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, et al. 2007. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. Science, 318(5858): 1920～1923

Kim JB, Zaehres H, Wu G, et al. 2008. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. Nature, 454(7204): 646～650

Rolletschek A, Wobus AM. 2009. Induced human pluripotent stem cells: promises and open questions. Biol Chem, 390(9): 845～849

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell, 131(5): 861～872

Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell, 126(4): 663～676

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science, 282(5391): 1145～1147

Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, et al. 2008. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts

functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. Proc Natl Acad Sci USA ,105(15): 5856～5861

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K ,et al. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science ,318(5858): 1917～1920

Zhou H, Wu S, Joo JY ,et al. 2009. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. Cell Stem Cell ,4(5): 381～384

撰稿人：蒋建利
第四军医大学

超声回波隐含信息的揭示

The Discovery of Hidden Information from Ultrasound Echo

医学成像发展已经有超过 50 年的历史了。由于超声成像具有安全、无创、便携、易用、价格便宜、实时等优势，在 20 世纪末，超声检查占各类医学影像检查方式的比例已超过四分之一，且这一比例还在持续上升。正是不断揭示超声回波内的隐含信息推动了医学超声成像发展。

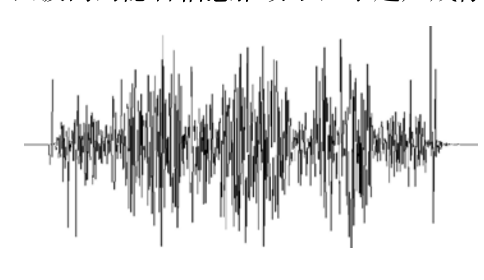


图 1　超声回波图

当我们使用医学超声仪器，通过超声探头在体外向人体组织内发射超声波时，人体组织内部就不断有超声回波产生，其回波又通过超声探头接收，用普通示波器就可以观察到如图 1 所示的典型超声回波图，大量来自人体内的信息隐含在其中。几十年以前，人们就开始研究如何从中发现和提取有用的信息。

人们首先认识到，超声的反射和折射所产生的组织内部各层次回波，有不同的幅度变化信息，决定此幅度信息的物理基础则是人体内声特性阻抗值的差异性，利用这些信息并进行变换就可以进行超声诊断。1952 年，美国 Wild 等做了先驱工作。他们应用脉冲反射式 A 型超声诊断仪（简称 A 超）分析组织结构，这是一种将检测出来的超声回波包络幅度表示为纵坐标、超声传播时间表示为横坐标的显示方式。然而，A 超所显示的波形图只能反映某一方向的一维深度各点的回波波形信息，缺少二维解剖形态。20 世纪 60 年代末，B 型超声诊断仪（简称 B 超）被广泛研究。B 超也是以回波的幅度调制光点亮度，再加上声束平面扫描，就形成二维显示断面图。此成像方法检测的实质还是以界面的声特性阻抗差形成的幅度信息作为成像参数。

在提取幅度信息进行成像之后，人们又考虑到胎心、瓣膜、血管壁、血流等都是人体中的运动体，当超声照射到它们时会产生多普勒效应。因此，只要在体外检测出由体内运动体产生的多普勒频移信号就可无创伤地揭示体内运动速度信息。20 世纪 50 年代末，Fram Kein 研制出脉冲多普勒超声。多普勒超声诊断法主要用于心血管，以频谱显示血流动力学指标。频谱多普勒法能在某个特定位置精确地定量血流。为能使血流速度分布形象化，彩色多普勒血流成像法（color

doppler flow imaging，CDFI）将某个特定区域内的血流速度映射为一幅伪彩色图像，并且实时显示在一幅二维 B 超图像之上。20 世纪 80 年代初，彩超兴起，日本 Aloka 公司首先推出血流彩色成像。深圳安科公司也于 1989 年研制和生产出中国第一台彩超。彩超以伪彩色图像显示血流动力学指标，在心脏、外周血管检查及某些肿瘤的良恶性鉴别上，进一步补充和完善了 B 超的诊断。

以上两种信息的揭示，都沿用了线性声学的规律。实际上，声波在介质中传播，以及在反射和散射时，都具有非线性效应，导致产生谐波。其中二次谐波幅度最强，其他高次谐波都可忽略不计（图 2B）。揭示人体回波中谐波信息并进行成像，尤其是利用超声造影剂的谐波成像是超声诊断技术的又一次飞跃。超声造影剂产生的微泡的声学特性如图 2 所示。

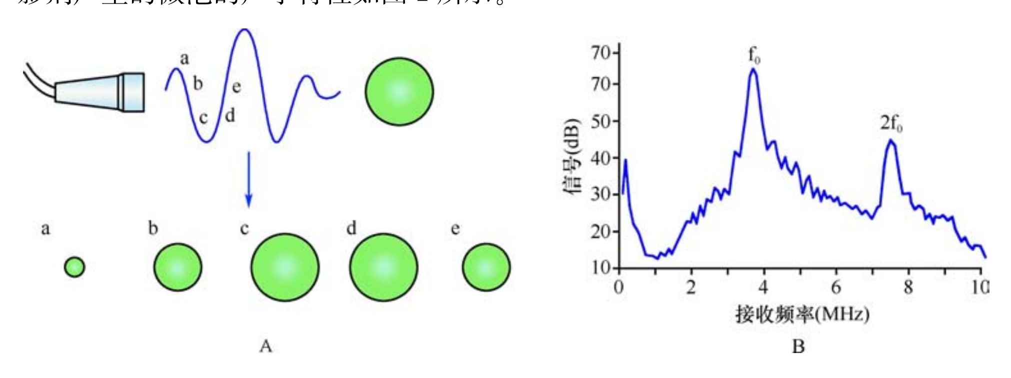


图 2　微泡的声学特性

A. 在 500kHz 超声作用下，微泡的显微图像；B. 微泡信号的产生。修改自 Lindner JR. 2004

1984 年，Feinstein 等发明了利用声振法制备由白蛋白包裹的微泡超声造影剂的方法。这类造影剂在血液中的持续时间明显延长，而且直径明显缩小甚至达到细胞甚至分子水平，所以有人称谐波成像技术标志着超声成像开始跨入分子成像时代。此外，可将超声造影剂作为一种载体，利用超声波与微泡造影剂的相互作用及所产生的生物学效应，实现携带药物、基因等靶向组织的转移释放，起到靶向治疗的作用。

千百年来，医生们常常使用“触诊”来检测某些疾病，因为“坚硬”的组织通常是早期病变的标志：当软组织发生病变时，其组织的弹性特征会随之改变。此外，现代医学成像仪器对肿瘤的漏诊时有发生，这是因为现有医学成像模态中缺少由“触诊”获取的信息。这就启示人们应当提取与组织弹性有关的参数，以弥补医学成像模态的不足。

1988 年，Lerner 和 Parker 提出了有里程碑意义的声弹性（sonoelasticity）技术，首次将感兴趣区域表示成一幅图像，该图像显示了一个由软组织包绕的高硬度区域的检测情况。1991 年，Ophir 等提出了弹性成像（elastography）技术，

采用外部压迫的方法获得应力图像，可显示患者的炎症、增生、纤维化病变。

作为一种全新的成像技术，超声弹性成像可用于肿瘤（乳腺癌、前列腺癌等）检测、热治疗监测、肾移植监测等方面，被称为继 A 型、B 型、D 型、M 型之后的 E 型（elastography）模式，具有非常重要的临床价值和广阔的应用前景。

回顾过去几十年，从超声回波中检测出幅度信息，到检测出多普勒频移信息，进而检测出谐波信息、弹性信息，可以说超声回波信号的检测历史就是一部不断发展的揭示隐含信息的历史。从 B 超、彩超到谐波成像、弹性成像……应该说每一步都有一个跃进，但都没有带来根本性的突破。

难点有两个：一是要突破前面所述的声特性阻抗差异成像的传统，找到新的成像参数；二是要改变超声成像除了实时无创地揭示器官解剖信息外，还要获得病变的功能信息及分子水平的信息。

提高图像质量、显示更细微的组织结构始终是超声回波检测技术发展的目的，也决定着发展趋势。而成像参数对图像质量的影响尤其明显，寻找新的更能反映人体生理和病理状态的成像参数，并完善新参数的成像方法是今后面临的一大难点。传统的医学超声成像实际上是声特性阻抗分布图，其包含的信息是有限的。而新的声学参量成像将可以分别是组织声衰减、声速、散射系数、相位和频谱的空间分布图，不但图像本身质量高，而且图像包含的信息量也丰富。长期以来，已有大量的基础研究在继续寻找各种新的成像参数。其研究前沿及可能有进一步突破的领域目前聚焦在以下几方面：

继超声谐波信息揭示和应用后，超声非线性声学参数信息的揭示和研究一直没有停止。例如医学超声衰减信息提取和应用，有可能揭示新的组织结构信息。对于某些病变组织（如脂肪肝）与正常组织，它们的 B 超图像差异不明显，但是声衰减系数相差数倍，利用这一特性，即可诊断出病变组织。

医学超声有关交叉学科的发展和应用，在前述的超声谐波成像基础上进一步和分子生物学结合，发展成超声分子成像。通过将目的组织区域敏感的特异性抗体或配体连接到超声造影剂，使其在超声造影过程中主动作用于目标区域分子，从而提高超声诊断的敏感性。因此，超声造影剂是超声分子成像的关键和基础。尤其是如今技术的进步已使疾病的诊断及治疗成为一体，携带基因或药物的靶向治疗超声造影剂应运而生。靶向造影剂性能是否优良，靶点的选择优化，与靶点结合的牢固性、稳定性及粒径的控制等也成了日益突出的问题。

编码通讯技术和超声技术结合，改变了“发射脉冲进、脉冲回波出”的传统低效率的成像方式，实现了信息量丰富的编码超声成像技术。因此，选择好的编码是提高成像质量的关键和仍需探索的方向。此外，将射频技术或激光技术与超声波技术有效地结合，改变了传统超声成像“声进声出”和传统光学成像的“光

进光出”，实现了“光进声出”。即发射激光或射频进入人体，通过激光或射频吸收、转变成超声回波，其回波中含有吸收过程中携带的生物化学和组织特性信息。例如癌变组织由于血供、新陈代谢均不同于正常组织，即可通过这一技术被检测出来。

可以预见，新的超声隐含信息的检测将会带来超声成像新的进步和根本性的突破。

参考文献

陈思平. 2005. 医学超声影像产业现状和发展. 应用声学, 24(4): 201～207

汪立宏. 2009. 光声成像的未来. 光学与光电技术, 7(3): 20～26

王威琪, 汪源源, 余建国. 2002. 诊断用医学超声学的现状. 声学技术, 21(1-2): 4～14

周永昌, 郭万学. 2002. 超声医学. 第4版. 北京: 科学技术文献出版社

Jin C, Chen SP, Qin ZD. 2009. A new coding scheme in coded ultrasound using repetition interval staggering. J Zhejiang Univ Science, 10(8): 1213～1216

Jirik R, Taxt T. 2004. Ultrasound attenuation imaging. J Elect Eng, 55(7-8): 180～187

Lindner JR. 2004. Microbubbles in medical imaging: current applications and future directions. Nat Rev Drug Discov, 3: 527～532

Ophir J, Cespedes I, Ponnekanti H, et al. 1991. Elastography: a quantitative method for imaging the elasticity of biological tissues. Ultrason Imag, 13: 111～134

Wild JJ, Reid JM. 1952. Application of echo-ranging techniques to the determination of the structure of biological tissues. Science, 115: 226～230

York G, Kim Y. 1999. Ultrasound processing and computing: review and future direction. Annu Rev Biomed Eng, 1: 559～588

撰稿人：陈思平
深圳大学

仿生人工鼻与人工舌是如何实现的

The Principle of Artificial Nose and Tongue

在传感技术及信息获取中，视觉、听觉、触觉的传感技术和信息获取手段已经有了较深入的研究和发展，但人们对嗅觉和味觉的研究却相对贫乏。人类及动物的嗅觉和味觉器官是特殊的化学生物敏感器官，它对于环境中各类气味和味道的异乎寻常的敏感性引起了人们的极大兴趣。一些动物的鼻子和舌头是异常灵敏和可靠的，是现有工程手段设计的气味和味道传感器所无法比拟的。随着生命科学和人工智能研究的发展，人类试图探索和模仿动物及人类的嗅觉和味觉功能研制仿生的人工鼻和人工舌。仿生人工鼻和人工舌在食品安全、生物医学、环境保护、公共卫生、防恐及军事等领域具有潜在的广泛用途。在过去的十几年里，有关人工鼻和人工舌的仿生研究取得了显著进展，为研制和应用仿生人工鼻和人工舌提供了可能。

目前嗅觉和味觉感受器电势产生的机制尚不是很清楚，主要原因是目前还缺乏在系统、组织、细胞和分子水平上对嗅觉和味觉感受器及其神经传导过程进行研究的有效手段。生物的嗅觉是对物质气味分子的识别过程，气味物质分子先到达初级嗅觉神经元。初级嗅觉神经元是由感受器和嗅觉神经组成的双极神经元，对气味的响应有很高的灵敏度和交叉响应特性。感受到的信息经神经元的轴突到达嗅球。嗅球是由初级神经元会聚于此的二级神经元，具有对初级嗅觉神经元的信息进行调节和抑制的作用，最后嗅觉信号经大脑产生相应的判断反应。

味觉识别的理论有定味基理论、助味基理论、物理吸附理论、生物酶理论、化学反应理论等。上述理论各有所见，其中有代表性的定味基和助味基理论是指味觉感受体与刺激物能形成不同的化学键结构，如质子键、盐键、氢键和范德华键的结构是分别产生酸、咸、甜和苦的定味基，其他与受体结合的键合结构通称为助味基。味觉可粗略分为酸、咸、苦、甜和鲜五种基本类型。在生物味觉系统中，味觉物质在微孔味觉细胞上被接收并产生电信号，该信号在味觉神经上产生一系列电脉冲。这些电脉冲经味觉神经送到大脑，再经大脑判断和识别产生不同的味感。

早期的人工鼻和人工舌的研究主要是从简单的外部特性模拟或功能的仿生设计出发，采用气体或离子、分子敏感的传感器组成气味和味道敏感的传感器阵列，结合模拟大脑的信号识别技术组成了与生物嗅觉和味觉功能接近的人工鼻或

电子鼻及人工舌或电子舌（图 1）。



图 1　仿生人工鼻和仿生人工舌示意图

近年来，随着生物技术、电子技术和精密微加工技术的快速发展，使得直接采用嗅觉和味觉细胞传感器监测气味和味道的手段得到了应用。细胞传感器提供了一种连续无损监测细胞电活动的方法，嗅觉和味觉细胞传感器提供了大量的数据采集通道，把从具有电活性的细胞构成的神经网络获得的数据传输出来。传统的细胞记录技术在细胞生理研究中，已经取得了很大的突破，但是，在研究信号在细胞之间的传输路径方面，大部分电生理分析无法实现胞间传播信号的测量（例如，神经元的突触传递，或者细胞之间的间隙连接进行的信号传播）。此外，细胞内记录和电压敏感探针是有损伤的检测方法，限制了标准电生理测量和光学方法的应用。因此，基于微电子集成芯片技术的细胞传感器成为研究嗅觉味觉细胞网络动力学长期记录的一种强有力的工具。

生物嗅觉和味觉系统可以分辨和识别成千上万种不同的气味分子和液态离子，具有很高的灵敏度和特异性。随着嗅觉和味觉机制研究的不断深入以及现代生物医学传感技术的不断进步，人们模仿嗅觉和味觉感知气味和味道的机制，以生物活性材料如细胞和分子受体等作为敏感元件，耦合各种二级换能器，构建了多种仿生嗅觉和味觉传感器，如图 2 所示。由于引进了受体神经元、天然的或异源表达的嗅觉受体蛋白等生物活性材料作为敏感元件，仿生嗅觉和味觉传感器获得了部分生物嗅觉和味觉系统具有的优点，例如灵敏度高、检测限低、选择性好等。可以广泛应用于生物医学、药物开发等诸多领域，具有很大的应用前景和商业开发潜力。

未来的人工鼻和人工舌的一个重要发展方向将是在仿生设计的基础上建立嗅觉和味觉感受器的细胞和分子模型，在细胞和分子水平上分析和模拟气味和味道作用于细胞后的响应过程。在此基础上研制基于细胞和分子的传感器技术，结合芯片技术设计和制作嗅觉与味觉细胞传感器的加工和工艺以保证细胞与传感器的结合。嗅觉细胞和味蕾细胞的培养和固定化，包括嗅觉和味蕾细胞的分离、培养、固定、存活条件以及测试过程中细胞反应生化过程的分析等。其中，将采用包括物理、化学等方法对硅器件表面进行处理以保证细胞的附着和良好的接触；细胞动作电位等物理、化学和生物参数的同时检测技术；细胞的信号处理技术和干扰信号的抑制等；细胞和分子芯片用于气味和味道刺激的系统化数据库和分析软件平台设计：建立嗅觉和味觉的分子识别数据库、分子识别软件平台；包括嗅觉和味觉的特征图谱，在细胞和分子水平上实现嗅觉和味觉的神经传导和编码、解

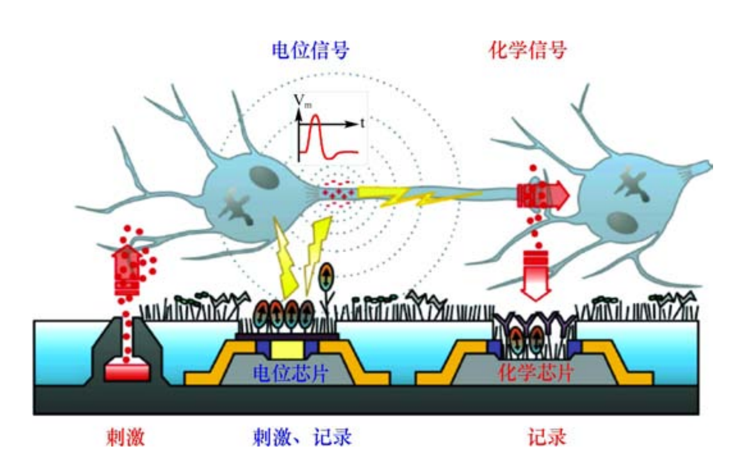


图2　生物嗅觉和味觉仿生细胞传感器示意

码识别过程等。未来也可能将仿生人工鼻与人工舌技术，用于人类的嗅觉和味觉功能损伤的修复等康复医学，以及应用于食品安全、环境质量检测等广泛领域。

参考文献

Ache BW, Young JM. 2005. Olfaction: diverse species, conserved principles. Neuron, 48: 417～430

Buck L, Axel R. 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. Cell, 65: 175～187

Gilbertson TA, Damak S, Margolskee RF. 2000. The molecular physiology of taste transduction. Current Opinion in Neurobiology, 10: 519～527

Kensaku M, Hiroshi N, Yoshihiro Y. 1999. The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. Science, 286: 711～715

Li Y, Liu QJ, Xu Y, et al. 2002. The development of taste transduction and taste chip technology. Chinese Science Bulletin, 50: 1425～1433

Liu QJ, Cai H, Wang P. 2006. Olfactory cell-based biosensor: a first step towards a neurochip of bioelectronic nose. Biosens Bioelectron, 22: 318～322

Miyamoto T, Fujiyama R, Okada Y. 2000. Acid and salt responses in mouse taste cells. Progress in Neurobiology, 62: 135～157

Owicki JC, Parce JW, Kersco KM. 1990. Continuous monitoring of receptor-mediated changes in the metabolic rates of living cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, 87: 4007～4011

Wang P, Liu QJ. 2009. Cell-Based Biosensors: Principles and Applications. New York: Artech House Publishers

撰稿人：王　平
浙江大学

临床决策支持与人工智能

Clinical Decision Support and Artificial Intelligence

1. 临床决策支持背景和历史

临床决策支持系统（clinical decision support system，CDSS）是能够向临床工作者、患者或个体在适当的时机、以适当的方式提供最合适的医学知识和信息，以提供更好的健康管理和患者护理服务，促进人群健康水平提高的方法和手段。可以认为，临床决策支持系统是人工智能技术在医疗领域中的典型应用。

20 世纪末至 21 世纪初期，在美国医学研究机构的两份报告“To Erris Human：Building a Safer Health System”和“Crossing the Quality Chasm：A New Health System for the 21th Century”中提到：目前的医疗过程中存在着大量实际可以避免的医疗差错和事故，医疗实践和理想之间差距很大。随着医院信息化程度的不断推进，医生作为医疗行为中的主体，在对患者进行诊断和治疗等活动时需要获取和使用的信息量越来越多，但是医生很难在整个长期的诊疗过程中记忆相关的临床信息和医学知识。因此很容易出现医疗差错，降低了工作效率，进而提高了医疗成本。这种医疗现状促使了临床决策支持系统的产生和发展。

早在 20 世纪 50 年代末，Ledley 和 Lusted 等学者就撰文讨论了利用计算机人工智能的手段辅助医生决策的原理和可行性。1972 年，AAPHelp 系统最早尝试在不确定性条件下进行自动化推理，并用于诊断急性腹痛。世界上第一个功能较全面的临床决策支持系统是 20 世纪 70 年代斯坦福大学的 Shortliffe 等研发的 MYCIN，它是一个基于规则的专家系统，面向血液感染进行诊断并提供治疗建议，后期扩展到处理其他感染性疾病。1982 年，匹兹堡大学的 Miller 等研发了 Internist-I 内科计算机辅助诊断系统，其知识库包含 572 种疾病、4500 多种症状。Internist-I 采用启发式规则和分层或分类决策树逻辑，对于患者只有一种疾病时，辅助诊断效果最佳。

在临床决策支持系统的发展历史中，最具有代表性的是 HELP（health evaluation through logical processing）系统。HELP 于 1967 年在犹他州盐湖城的 Latter Days Sants 医院开始投入使用，它率先利用医院信息系统（hospital information system）收集患者数据，同时结合了医学知识和推理引擎辅助临床医生进行决策。该系统持续开发和测试超过 25 年，并逐步提供了一系列与医院信息系统结合得非常完善的决策支持子系统，提供警报/提醒、数据解释、患者诊断、患者管理建议和临床协议等辅助支持。

2. 临床决策支持发展遇到的问题

尽管临床决策支持系统的研究从20世纪50年代就已经开始，并且也取得了大量的成绩，但是国内外真正在临床上获得实用的临床决策支持系统却寥寥无几。究其原因，有知识表达、智能推理和人机交互三个方面的难题制约着临床决策支持的实际应用，其中前两个方面都是以人工智能技术发展为基础。

(1) 知识表达：最初，临床决策支持研究主要应用统计学、决策分析及规则链等方法，拟通过固定内嵌的知识或者算法模拟人类思维，试图达到或者超过临床医生的水平。大约20世纪60年代开始出现的一些早期的知识表达体系包括基于临床运算法则、基于概率论的贝叶斯统计模型、回归预测模型等。后期随着人工智能技术的发展，使得人工神经网络模型、遗传算法等技术也应用到临床决策支持中。但是这些知识表达方法都不具有循证特点，医生很难理解临床决策支持的过程，因而临床应用非常有限。此外，这类临床知识固定在决策系统中，使得知识管理和知识共享非常困难。因此，逐步出现基于知识库的临床决策支持系统，它将知识分离出来形成知识库，并采用标准化的表示方法，主要包括基于规则和基于指南两大类。尽管基于规则的医学知识表达方式出现较早，但是由于其在过程性知识表达上的缺陷，逐渐被基于临床指南的表达方式所取代。基于临床实践循证和计算机可理解的临床指南模型成为近年研究的热点。

(2) 智能推理：针对不同的决策需求存在着不同的知识表示方式，从而形成了不同的决策机制。早期CDSS大多采用基于概率推理、决策树分析等机制。具体实例有早期基于精确概率的Leeds Abdominal Pain系统及基于近似概率的Dx-plain和QMR（quick medical reference）系统。

随着人工智能技术的发展，出现了一大类无需用户录入知识的临床决策支持系统，它依赖机器学习（machine learning）原理从大量的实例中自动获得知识。常见的学习算法有贝叶斯网络、支持向量机、人工神经网络、基于相似性的算法等。但此类系统的缺点是系统难以提供易于理解的解释。

随着循证医学和临床指南的发展，逐渐开始出现了基于推理规则和基于临床指南的CDSS。最著名的基于推理规则的系统是MYCIN系统，它用于指导抗生素的用法，但由于各种原因该类专家系统并没有在临床中得到实质性应用 。近期在国外临床中应用的事件监视器（event monitor）也是基于推理规则的决策支持系统，如比较早的HELP系统和哥伦比亚大学医学院的事件监视器系统。这些系统通过事先定义好的规则来实时地监视患者的相关信息，一旦规则中的前提条件得到满足，相关规则将被触发，继而采取规则中规定的行为，或是对诊断或治疗提供决策支持。

医学知识是一个相当复杂的体系，现有的传统推理技术还无法模拟医生诊断和治疗的决策过程。随着个性化医疗的发展，智能推理方法是临床决策支持系统

迫切需要解决的难题。

（3）人机交互：人机交互方式是划分临床决策支持系统类型的一个比较重要的维度。早期的临床决策支持系统大多独立于医生临床工作流程之外，医生要获得帮助不得不在决策支持系统中再次输入患者的信息，造成时间的浪费。例如早期的 MYCIN 系统，用户不得不从当前的工作中停下来转到 MYCIN 系统所在的计算机上，并且要重新输入患者的信息后才能获得决策支持的结果。

现代的决策支持系统强调 3R（right time，right place and right person）原则，即在最适当的时机向合适的医生提供最适当的临床决策支持 。因此 CDSS 越来越注重与医生临床工作流程的融合，医生应在临床工作中不受或很少被干扰，可以迅速地获得决策支持。如 HELP 系统中的各种事件监视器系统，可以在用户完全不被干预的情况下发出各种警告。与电子病历无缝整合的一键通技术（InfoButton）能够在完全不干扰医生工作流程的情况下给医生提供必要的决策相关信息 。

CDSS 中人机交互还有很多没有解决的重要问题。例如，过度的提醒会引起使用者的提醒疲劳（alerting fatigue）等，这些都是临床决策支持系统真正走入临床必须解决的难题。

参考文献

Cimino JJ, Li JH, Suzanne Bakken, et al. 2002. Theoretical, empirical and practical approaches to resolving the unmet information needs of clinical information system users. Proc AMIA Symp, 170～174

Cimino RM, Li JH. 2003. Sharing infobuttons to resolve clinicians′ information needs. Proc AMIA Symp, 815

Feldman MJ, Barnett GO. 1991. An approach to evaluating the accuracy of DXplain. Computer Methods and Programs in Biomedicine, 35(4):261～266

Gardner RM, Pryor TA, Warner HR. 1999. The HELP hospital information system: update 1998. International Journal of Medical Informatics, 54(3):169～182

Masarie FE Jr. Miller RA, Myers ID. 1985. INTERNIST-I properties: representing common sense and good medical practice in a computerized medical knowledge base. Computers and Biomedical Research, 18(5):458～479

Mor Peleg, Samson WT. 2006. Decision support, knowledge representation and management in medicine. Methods Inf Med, 72～80

William van Melle. 1978. MYCIN: a knowledge-based consultation program for infectious disease diagnosis. International Journal of Man-Machine Studies, 10(3):313～322

撰稿人：段会龙
浙江大学

无创血压的测量问题

Non-invasive Measurement of Blood Pressure

1733 年，英国生理学家黑尔斯采用有创法进行了马的血压的直接测量，有创血压测量至今是连续进行血流动力学精确监测的主要手段。广泛使用的柯氏音法（Kopomko B）基于充气袖带和脉搏音监听的方法，仅能获得偶读血压或者长间隔（15 分钟以上）血压，并不能实现真正意义的动态连续血压监测 。连续血压信号中蕴含着丰富的血流动力学信息，血压水平及其昼夜节律监测具有重要的临床价值，如何实现无创无扰动的连续血压精确测量一直是生物医学工程的重要命题 。

心脏、血管（动脉、静脉和毛细血管）、血液组成了人体心血管系统。心脏不停地以一定的节律泵出血液，进入动脉和毛细血管，再经由静脉回流到心脏。人体血压是指心脏收缩时血液流经血管对管壁产生的侧压力，是心室射血和外周阻力共同作用的结果。血压分为动脉压与静脉压，通常说的血压指的是动脉压，它和心脏功能及外周血管的状况有密切联系。血压在每个心动周期都连续变化，心室收缩，血液从心室流入动脉，此时血液对动脉的压力最高，称为收缩压；心室舒张，动脉血管弹性回缩，血液仍继续慢慢向前流动，但血压下降，此时的压力称为舒张压。一个完整的心动周期中的平均压力称为平均压。

血压波形的产生受心脏泵血能力、心脏节律、血液黏度、血管粗细和血管弹性多种因素的综合作用，血压波形中蕴含着丰富的人体心血管信息。我国中医的切脉最早将血压和脉搏应用于疾病诊断，虽然其机制尚未明确。现代医学采用弹性腔模型，包括单弹性腔模型（图 1）和双弹性腔模型（图 2）。一般条件下，基于弹性腔模型的仿真血压曲线与实际血压测量曲线的相关系数可以达到 0.9 以上，具有很好的一致性。从连续血压曲线中至少可以获得如外周阻力 R、动脉顺应性 C 等重要心血管系统参数，对疾病的早期诊断具有重要意义。

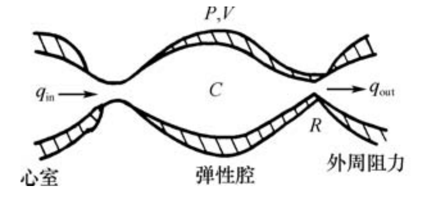


图 1　动脉单弹性腔模型

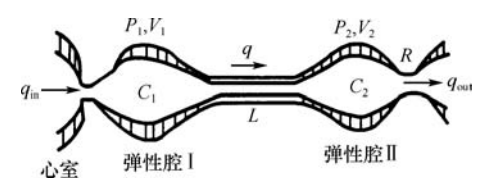


图 2　动脉双弹性腔模型

通过穿刺血管并放置导管或者压力传感器可以获得被测点的精确血压值和血压搏动曲线。但是动脉穿刺具有一定的危险性，可能导致动脉穿刺并发症的产生，因此有创血压监测一般仅应用于高危患者血流动力学监测和重大手术监测。

无创血压测量采用间接测量方法，经典的柯氏音法和现代电子血压一般采用充气带测量血压。充气法血压测量具有无创、成本低等优点，在临床常规血压检测中广泛应用。但是反复持续的充气测量，会使手臂受压迫而导致血液流通不畅，引起血压值变化。因此充气法血压测量仅能获得偶读血压或者长间隔(15 分钟以上)血压，并不能实现真正意义的动态连续血压监测。其他间接法测量血压方法还有动脉张力法、容积补偿法、容积描记法、超声法等，但是这些方法均因其固有的缺点而尚未被临床广泛接受。

无创连续血压监测需要对人体昼夜 24 小时内血压值变化的规律和人体每搏血压的波形曲线进行监测，其最大的难点在如何获得无扰动的血压值。采用袖带充气法测量，袖带频繁地充气和放气，晚间影响患者休息，使测量结果不能真正反映患者日常活动时的血压变化情况。

脉搏波是由血压搏动而产生的，根据 Lambert-Beer 定律，在一定强度和波长的光照射下，透过血管的光强与其光程相关，而光程与压力导致的血管收缩与舒张相关。通过建模和数学推导可知，被测血管压力 P 与透过该血管的光强 I 有以下关系：$\Delta P = \frac{k_2}{k_1} \cdot \Delta I$。因此我们可以知道光学投射法测量得到的光强曲线与被测血管的血压曲线形状相似，但是由于光强还受组织、皮肤、灌注和夹持位置等的影响，其数值与血压绝对值不存在唯一相关性。

基于脉搏波传导时间的血压连续测量方法非常适合应用于动态血压监测，其基本原理是血管壁弹性模量随着血管压力升高而升高，脉搏波传导速度随血管壁弹性模量增加而增加，即脉搏波传导速度随着血管压力升高而增加。模型分析表明，人体血压 P 和脉搏波传导时间 T 的关系为 $\Delta P = -\frac{2}{\gamma T}\Delta T$，因此测量脉搏波传导速度（pulse wave velocity，PWV）或者脉搏波传导时间（pulse transfer time，PTT）可以推算人体血压（图 3 和图 4）。研究表明，PTT 或者 PWV 与收缩压呈现较好的线性相关性，但是与舒张压和中间压的相关性较小。

因此，无创连续血压测量的难点在于无创舒张压的连续测量。现有的研究一般引入脉搏波波形特征参数并对脉搏波特征参数与舒张压进行回归分析，试图通过统计学方法来建立舒张压与脉搏波特征参数之间的方程，从而实现无创连续舒张压的测量。这种方法并没有对血压产生的生理机制以及血压与心血管系统参数之间的生理关系进行研究，也没有一个完整的数学模型反映血压与心血管系统参数与脉搏波之间的相关关系，所以建立的回归方程并不能从本质上反映脉搏波与

血压变化的相关关系。采用统计方法获得的舒张压测量值不能保证个体和群体参数存在差异时的适用性问题。

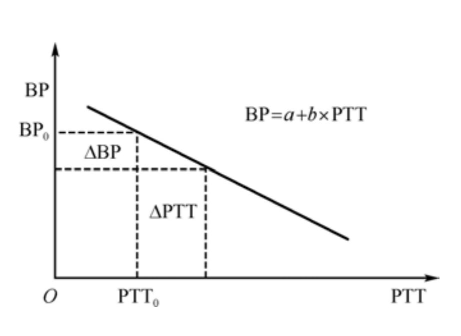


图 3　脉搏波传导时间（PPT）与收缩压关系

图 4　脉搏波传导时间（PPT）与收缩压实测结果

满足临床要求的无创连续血压测量不仅是生物医学工程的难题，而且具有重要的临床意义和应用价值。因而吸引了国内外研究者、科研机构和公司持续不断地进行研究，各种新方法和新理论不断涌现。随着生理学、检测方法、心血管系统数学建模和信号提取算法等手段的不断更新，相信在不久的将来一定可以解决该难题。

参 考 文 献

李顶立,陈裕泉,邢雷,等. 2008. 基于脉搏波速法的无创连续血压检测系统. 航天医学与医学工程,21(5)

李顶立,陈裕泉,邢雷,等. 2008. 基于小波变换的无创血压检测方法研究. 浙江大学学报工学版,9:1648～1652

Gedes LA,Voelz MH, Babbs CF,et al. Pulse transit time as an indicator of arterial blood pressure. Psychophysiology,18:21～24

Ingelfinger JR. 2002. Ambulatory blood pressure monitoring as a predictive tool. The New England J Med,347:778～779

John G. Webster. 1998. Medical Instrumentation. New York:John Wiley & Sons, Inc

Payne RA,Symeonides CN,Webb DJ,et al. 2006. Pulse transit time measured from the ECG: an unreliable marker of beat-to-beat blood pressure. J Appl Physiol,2006. 100:136～141

撰稿人：叶树明
浙江大学

生物医学材料的生物活化与功能化

Bioactivation and Functionalization of Biomedical Materials

生物材料（又称生物医学材料）是指用于诊断、治疗、修复、替换人体组织或器官，或增进其功能的材料和医用植入体等。随着近代材料科学、生物学和医学的发展，生物材料的飞速进步使医学技术和临床治疗方法进入了新的时代，极大地推动了健康领域的研究和应用水平，对人类健康具有重要的作用。生物材料经历了从生物惰性材料到生物活性材料、到生物功能材料的发展过程，不仅单纯地提供医疗过程中所需的各种物理和化学性质，而且利用体内各种天然环境的作用，直接参与生命活动过程，对疾病的诊断治疗、缺损组织的替换修复、脏器功能的恢复和促进等起到积极作用。

生物材料的使用可以追溯到公元前3500年，古埃及人用棉花纤维、马鬃做缝合线缝合伤口。人类很早就用黄金来修复缺损的牙齿。16～17世纪就有文献记载用黄金板修复颚骨，用金属固定体内骨折，到19世纪初出现了大量有关应用金属板固定骨折的报道。

早期的生物材料更多的是利用材料的物理及化学性质，对生物学性能的主要要求是材料在生理环境中保持稳定，即保持惰性。这种惰性材料的主要问题是其生物相容性不足。例如以钛及其合金为代表的金属材料植入骨内时，与宿主骨间以机械嵌联为结合方式，在材料与组织的界面间存在纤维结缔组织膜，不能形成化学性的结合方式，稳固性不足，实际应用中容易引起植入体失效。当这类材料植入心血管系统内时，其血液相容性不足，可能引起凝血，同时可能造成血管再狭窄，从而造成植入失效。导致上述问题的原因是材料与宿主组织间的表面/界面反应。宿主组织与材料间发生生物惰性的生物学反应，产生纤维结缔组织界面层。在心血管系统，金属植入材料可能激活相关凝血因子诱发凝血效应，产生凝血；同时它还可能刺激平滑肌细胞增生，造成再狭窄。

为克服上述问题，根据生物材料与生物系统的相互作用，提出了生物活性的概念：生物活性材料植入体内后不仅不会引起人体的不良反应，还可通过材料与机体的相互作用，诱发特殊的反应，实现植入体与组织间的生物活性结合，或刺激、促进特定组织形成。典型的生物活性材料如生物玻璃，研究发现其植入体内后玻璃与骨组织之间有一层过渡层，为材料与机体反应形成的一层类骨样结构，依靠这个过渡层材料表面与宿主骨之间形成了生物活性结合。对于非生物活性的材料，可以利用各

种物理、化学、生物等表面改性技术对其进行生物活化，赋予其生物活性，使其在生物体内诱导发生生物活性的界面反应，从而与组织间产生生物活性的界面结合。

随着材料学和医学的进步，对生物材料提出了更高的要求，希望通过材料的生物功能化，赋予其生物功能性；利用材料的作用使病患部位恢复自然生物功能，实现病变或缺损组织或器官的永久康复或替换。材料与机体之间的相互作用会诱发机体的不同反应。由于材料学、细胞生物学、分子生物学与医学的进展，在细胞和分子水平上对材料与机体间的相互作用的认识不断加深，为进一步赋予生物材料特定的生物功能性的设想提供了可能性。我国生物材料科学家发现的具有骨诱导性的生物材料，被认为是这种材料-机体间相互作用诱发积极的生物学反应的重要例证：通过材料与机体的作用，调动机体自我康复和修复能力，从而诱导骨组织形成。由此材料生物活性的内涵进一步扩大（包括材料对组织形成的诱导性），成为当代生物材料发展的重点和前沿。

可以控制药物释放速度、减少或避免血药浓度的“峰谷”波动、使药物较平稳地持续发挥疗效的“药物释放系统”（drug delivery system，DDS）是生物材料的特定性能在生物体系中有效应用的重要领域。药物进入机体发挥相应的作用，需要突破一系列生物学屏障，利用生物材料与机体的特殊相互作用是一种有前景的输送药物方法。例如血-脑屏障（brain-blood barrier）的存在，使药物无法进入脑部，到达脑胶质瘤的病灶部位。应用以受体介导的跨细胞摄入机制可望实现有效地向脑内给药，利用大脑内皮细胞上存在受体分子，将药物与受体识别的载体相连接，通过载体-受体识别大脑内皮细胞上相应的受体分子而被吸收。同样，利用生物材料与不同生物屏障的相互作用，可望突破不同的生物学屏障，成为体内靶向给药的有效方法。例如高分子纳米粒子、脂质体、胶束等具有纳米尺度的药物载体，可以通过增强渗透（enhanced permeation and retention，EPR）作用在肿瘤组织中以较高的浓度聚集，达到对肿瘤的被动靶向作用。利用能识别肿瘤的抗体、多肽和凝集素等分子修饰纳米粒子及脂质体等载体的主动靶向技术，可使抗癌药物与肿瘤细胞结合，增加药物的聚集和进入肿瘤细胞的效率。同时，利用特别设计的载体材料，可以根据机体出现异常时就发出的一些特殊信号，如pH的微小改变、体温的变化等生理环境的改变控制药物的释放，使释放系统在到达目标前稳定，而在到达目标后，利用病灶处环境与正常环境之间的差异，释放药物。这些研究为治疗恶性疾病提供了令人振奋的新思路。但是靶向药物释放系统的研究涉及的基础和技术问题很多，对各种药物载体的作用效果、靶向机制的认识等都还有待进一步研究，新的靶向技术才能在真正发挥其优势。

但目前生物材料的生物活化和功能化的研究还处于方兴未艾的阶段，仍然面临巨大的挑战，有许多重要的理论或技术问题亟须解决。通过生物材料的生物活性和生物功能达到有效治疗疾病、实现病变或缺损组织或器官的永久康复等还依赖于

人们对材料与组织相互作用的深刻理解，以及具有特定生物活性或功能性结构的生物材料的设计和制备。目前已经深入到蛋白质、基因等分子层面研究生物材料与宿主组织间的相互作用。近年来，在生物材料表面装载或接枝具有生命活性的蛋白质、多肽物质的研究也日益受到研究者的重视。人们希望通过这些生命活性物质调控材料与细胞相互作用，使材料充分发挥其生物功能。然而，针对不同的应用目标，由于所作用的组织（如骨组织、肌肉组织、结缔组织等）不同，所需诱发的生物反应的要求有所不同。根据不同应用要求，设计、合成或从天然材料中筛选生物相容性良好的适当材料，进一步在蛋白质基因层面认识材料结构、组分与相关蛋白和基因的作用规律，掌握材料性质与其生物功能性的关系和调控手段，为特定的应用目标选择合适的材料和材料性质，将是目前面临的主要困难。

要开发理想的生物材料，还需要材料学、医学、生物学等多学科的深度交叉和协作，以及长期大量的工作。当前生物材料研究开发中，还有很多基本原理和规律没有阐明。生物材料的结构与生物功能的关系还需要进一步研究，生物材料在体内的各种生物学效应还需要进一步研究发现和深入探讨。

参考文献

师昌绪. 1995. 材料科学技术百科全书. 北京:中国大百科全书出版社

Brunette DM, Tengvall P, Textor M, et al. 2001. Titanium in Medicine, Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications. Germany: Springer, 457～648

Duncan R. 2003. The dawning era of polymer therapeutics. Nature Reviews Drug Discovery, 2: 347～360

Joki T, Machluf M, Atala A, et al. 2001. Continuous release of endostatin from microencapsulated engineered cells for tumor therapy. Nature Biotechnology, 19: 35～39

Liu XY, Chu PK, Ding CX. 2004. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. Mater Sci Eng R, 47: 49～121

Peer D, Karp JM, Hong S, et al. 2007. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. Nature Nanotechnology, 2: 751～760

Ratner BD, Bryant SJ. 2004. Biomaterials: where we have been and where we are going. Annu Rev Biomed Eng, 6: 41～75

Rvaglioli A, Krajewski A. 1991. Bioceramics and the Human Body. Amsterdam: Elsevier Science, 408～416

Yun YH, Dong ZY, Lee N. 2009. Revolutionizing biodegradable metals. Mater Today, 12(10): 22～32

撰稿人：张兴栋　樊渝江
四川大学

钙信号调控骨形成和骨吸收：骨质疏松机制

Calcium Signaling in Regulating Bone Formation and Resorption：Implication for Osteoporos

骨是机体中最为坚硬的器官，是构成机体基本轮廓的主要部分，担负着保护、支持重要脏器以及运动、造血等重要功能。而与此同时，骨又是机体内最为活跃的器官之一。在机体一生中，骨都在进行着骨形成与骨吸收的动态平衡过程。成骨细胞是执行骨形成的基本细胞，其主要来源于间充质干细胞。而骨吸收的过程主要是由破骨细胞来完成，其来源于 CD14 和 CD11b 前体细胞。骨形成与骨吸收的平衡被破坏则会引起骨的异常，例如骨质硬化或骨质疏松。据估计，将近 50% 的老年人都有或曾经患有骨骼方面的疾病。而随着目前老龄化社会的到来，骨疾病（例如骨质疏松及骨质增生等）的问题日趋严重。据不完全统计数据，目前全球骨质疏松患者超过 1 亿，已严重危害人类健康。因此，对骨骼的基础与临床、生理与病理的阐述将为预防及治疗骨疾病提供重要的线索与可能的途径。

骨的发育与重建过程是在一系列形态原（morphogen）、信号分子（signaling molecule）及转录因子（transcription factor）的精确调控下完成的。其中，钙信号通路是公认的对成骨细胞和破骨细胞生长、分化及功能起重要调控作用的调节机制。然而该通路在维持骨平衡中的确切功能及其上下游调控机制尚不十分清楚。在破骨细胞发生过程中，核因子-κB 受体激活剂配体（receptor activator of nuclear factor κB ligand，RANKL）可诱发胞内钙振荡并激活钙调磷酸酶，后者促使活化 T 细胞核因子 c1（NFATc1）的激活。NFATc1 是破骨细胞发生中的重要转录因子，其被激活并转入核内决定了破骨细胞的终末分化成熟，并对破骨细胞的骨表面黏附与吸收过程有着至关重要的作用。而在另一方面，研究表明钙调磷酸酶抑制剂 FK506 可以抑制成骨细胞的分化；然而在成骨细胞中条件性敲除钙调磷酸酶又可以促进成骨细胞分化并增加小鼠骨密度。同样，在小鼠体内敲除了 NFATc1 可显著抑制成骨细胞分化。另外，钙信号激活的钙调蛋白依赖性激酶Ⅱ同样对成骨细胞分化和破骨细胞增殖与分化起着重要作用。可见，钙信号通路在协调骨形成与骨吸收过程中处于关键的中心地位。

在胞内钙信号调控机制中，磷脂酶 Cγ（PLCγ）是其激活的重要介导体，它催化胞内磷脂酰肌醇水解生成二酰甘油（DAG）及三磷酸肌醇（IP3）。DAG 调

节蛋白激酶 C 家族成员的活化，而 IP3 介导胞内钙库的钙动员，引起胞内钙浓度短暂性升高并最终激活钙信号通路。PLCγ 包括两个蛋白亚型，即 γ1 和 γ2，其中 PLCγ1 表达较为广泛，而 PLCγ2 主要局限于造血细胞系中。虽然两亚型之间在结构与功能上都有着较大的相似性，两者在体内的作用却有着明显的不同，并且有证据表明两者在细胞信号转导链中的角色是不可互换的。然而，尽管对 PLCγ 在其他系统中的作用与地位有了较为明确的研究，但对它们在成骨细胞与破骨细胞的分化和功能中的地位尚不十分清楚。目前已知在破骨细胞形成过程中 RANKL 可诱导激活 PLCγ；而用化学物 U73122 抑制 PLCγ 活性可以阻滞 RANKL 诱导的胞内钙释放及随后的 NFATc1 活化，表明 PLCγ 在介导 RANKL 诱发的钙信号通路中具有决定性的作用。近年的研究进一步证实了在 RANKL 诱导的破骨细胞形成过程中钙信号的活化及 NFATc1 表达与作用取决于 PLCγ 的激活。PLCγ2 敲除的小鼠骨密度明显增加，体外培养骨髓前体细胞并不能诱导出破骨细胞，而且只有过表达 PLCγ2，而不是 PLCγ1，才能弥补这种缺陷，说明 PLCγ2 在破骨细胞发生过程中有着独特的作用。然而，破骨细胞同样表达 PLCγ1，并且在破骨细胞发生过程中 PLCγ1 同样被激活，表明该亚型可能对破骨细胞的分化、成熟及功能也起着某种调控作用，这尚需进一步的研究加以阐明。而在成骨细胞发生中已知 PLCγ 抑制剂 U73122 同样可以抑制成骨细胞分化，表明 PLCγ 介导的钙信号对成骨细胞分化也起着十分重要的作用，进一步的深入研究将会为此提供足够的证据。

对于 PLCγ 及其激活的钙信号通路的阐明尚存在许多困难。由于 PLCγ 及其调控的钙信号通路在机体其他系统中同样有着重要的作用，相关的动物模型建立存在着一定的难度。例如，PLCγ1 敲除的小鼠在胚胎早中期即死亡，研究者无法观察到该基因敲除对骨骼系统真正的影响。而 PLCγ2 敲除的小鼠虽然可以存活至成年，但该小鼠 B 细胞发育异常，存在着明显的免疫缺陷，已知免疫系统异常对骨骼系统有明显影响，因此该动物模型同样存在着不足之处。最近研究者利用 loxP/Cre 重组酶技术，发展出了组织特异性基因敲除的实验动物。该技术以成骨细胞或破骨细胞特异性基因启动子来驱动 Cre 重组酶仅仅在成骨细胞或破骨细胞中表达，从而使 Cre 介导的基因敲除只局限于骨骼系统而不影响其他系统的功能。因此，成骨细胞或破骨细胞特异性 PLCγ1 或 PLCγ2 敲除的实验动物模型的建立将极大地克服完全敲除基因所引起的非期望性效应或是胚胎死亡问题，从而进一步阐明 PLCγ 协调骨形成和骨吸收的重要分子机制，为预防和治疗骨质疏松症及其他骨形成和骨吸收失衡症提供重要的理论依据。例如，目前对骨质疏松的治疗主要集中于抑制破骨细胞功能及补钙等针对性方法，并没有涉及骨质疏松的本质问题。究竟是由于破骨细胞功能增强所引起，或是由于成骨细胞功能低下导致尚不得而知。而对于 PLCγ 及钙信号通路在骨骼系统中作用的阐述，可以

让研究者采用积极主动的治疗方案，激活或抑制钙信号通路，使特异、高效地治疗骨质疏松成为可能。

参考文献

Chen Y，Wang X，Di L，et al. 2008. Phosphorlipase Cγ2 mediates RANKL-stimulated lymph node organogenesis and osteoclastogenesis. J Biol Chem，283(43)：29593～29601

Fu G，Chen Y，Yu M，et al. 2010. Phospholipase C gamma 1 is essential for T cell development，activeation，and tolerance. J Exp Med，207(2)：309～318

HashimotoA，Takeda K，Inaba M，et al. 2000. Cutting edge：essential role of phospholipase C-γ2 in B cell development and function. J Immunol，165：1738～1742

Karsenty G，Wagner EF. 2002. Reaching a genetic and moleculear understanding of skeletall development. Dev Cell，2：389～406

Kurosaki T，Maeda A，Ishiai M，et al. 2000. Regulation of the phosphorlipase C-γ2 pathway in B cells. Immunol Rev，176：19～29

Regunathan J，Chen Y，Kutlesa S，et al. Differential and nonredunadant roles of phosphorlipase C gamma 2 and phosphorlipase C gamma 1 in the terminal maturation of NK cells. J Immunol，177(8)：5365～5376

Teitelbaum SL，Ross FP. 2003. Genetic regulation of osteoclast development and function. Nat Rev Genet，4：638～649

撰稿人：陈亚兵
阿拉巴马大学

内皮祖细胞到底是什么

What Exactly Are Endothelial Progenitor Cells

人体血管是一套独特的和动态的脉管系统，它与心脏合并形成一个封闭的循环系统，向全身输送氧气和营养成分并带走代谢产物，从而保证组织器官正常运转。血管从内到外主要由单层内皮细胞及其周围基底膜与周细胞和平滑肌细胞组成。器官和组织的血管新生包括两种形式：一种称为血管形成（angiogenesis），即狭义的血管新生，指在原先存在的血管基础上血管内皮细胞增殖、迁移，以发芽或非发芽的形式形成新的成熟血管；另一种称为血管生成（vasculogenesis），指由中胚层衍生的成血管细胞原位分化为内皮，形成新的毛细血管网。以往认为，血管生成仅存在于胚胎发育阶段，而自从 1997 年 Asahara 等首次证明出生后循环外周血中存在能分化为血管内皮细胞的前体细胞——血管内皮祖细胞（endothelial progenitor cell，EPC）后，越来越多的证据表明成人血管新生不仅存在血管形成，还包括依赖于内皮祖细胞的血管生成。

普遍认为内皮祖细胞来源于骨髓，新近也有学者认为循环中少数高增殖潜能内皮细胞也是内皮祖细胞的来源之一。它们具有循环、增殖、游走功能，并在体外能分化为内皮细胞、平滑肌细胞和心肌细胞样细胞，因此在血管形成中起显著的作用。正常情况下外周血中内皮祖细胞的数量相对较少，但在创伤或缺血时通过骨髓动员到外周血并增殖即能显著增加（图 1）。在多项大型的临床研究中发现，循环内皮祖细胞的数量和功能与心血管疾病风险因素的消长存在着密切的联系。高胆固醇、高低密度脂蛋白、高糖，高半胱氨酸、高尼古丁浓度环境已证实能损害体外培养的内皮祖细胞数目和功能。这些病理状态引起内皮祖细胞功能障碍的重要途径促进细胞内氧化应激，线粒体功能障碍，导致活性氧大量生成和一氧化氮生物利用度降低，加

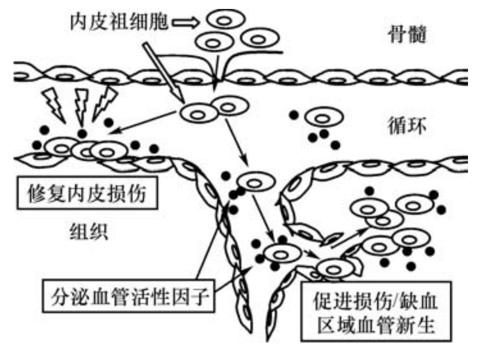


图 1　内皮祖细胞的主要生物学作用

内皮祖细胞从骨髓中迁移出来，募集至内皮损伤处分化为成熟内皮细胞，修补损伤区域，保持内皮完整性。内皮祖细胞也募集至缺血/损伤部位，一方面本身参与血管新生（包括血管形成和血管生成），另一方面分泌多种血管活性因子促进血管新生的发生发展

速内皮祖细胞的衰老和凋亡。多种因素如他汀类降脂药、ACEI 类降压药、雌激素、生理范围高切应力（即适度长期规律运动）或基因修饰可以提高内皮祖细胞对损伤因素的抵抗能力。

为什么人们对内皮祖细胞如此关注呢？因为虽然血管新生（angiogenesis）疗法用于治疗缺血性疾病的临床试验已有十年的历史，但疗效和安全性一直是很大的技术难题。一开始采用生长因子（growth factor，GF）基因导入的治疗性血管形成（therapeautic angiogenesis），到后来采用内皮祖细胞移植的治疗性血管生成（therapeautic vasculogenesis）阶段。内皮祖细胞治疗是针对某些疾病（例如糖尿病、动脉粥样硬化等）或老年患者血管内皮功能障碍、内皮细胞合成和分泌内源性生长因子能力降低、对外源性生长因子反应性也降低的状况而提出的“细胞补充”治疗策略。它通过补充内皮祖细胞数目来增加血管生长因子的作用底物，以达到更好的血管新生效果，提高对缺血性疾病的疗效。例如 Steinhoff 等在Ⅰ期试验中，对 15 例患者在冠脉搭桥（CABG）术中同时行自体骨髓 $CD133^+$ 细胞（包含丰富干细胞）心肌内注射。术后 6 个月，患者心功能显著改善，术后 3 年无手术相关不良事件发生。Ⅱ期试验中，共 40 例患者接受 CABG 或 CABG 联合 $CD133^+$ 细胞自体移植治疗。平均 44 个月，随访显示，细胞移植组 6 个月时心功能较单纯 CABG 组显著改善，说明内皮祖细胞可作为细胞疗法的理想的种子细胞。当然人们也设想通过移植血管，内皮祖细胞不仅直接应用于血管发育异常性疾病的治疗，而且也可作为促血管生长因子的载体，用于活体的基因治疗。

目前存在的主要问题是循环中的内皮祖细胞数量非常少，故需要通过体外扩增获得。内皮祖细胞可以通过从外周血或骨髓经密度梯度离心后的单个核细胞群，经过体外诱导培养获得。分离后的细胞在加有如血管内皮生长因子（VEGF）等的培养基培养，可以促进内皮样细胞的发育。体外培养时加入多种生长因子，用特殊的黏附底物（如纤维连接蛋白）；在体内与细胞外基质或周围成熟的内皮接触，都可能影响源自骨髓的内皮祖细胞增殖、分化。而根据其在体外培养出现时相的不同，又可将内皮祖细胞分为早期内皮祖细胞和晚期内皮祖细胞，它们在血管生成的过程中可能扮演着不同角色。早期内皮祖细胞在体外培养的 1 周内出现，它们的寿命只有 3～4 周不能独立在体外培养的胶状基质 Matrigel 上形成管形结构，需要成熟内皮细胞辅助才能完成。然而它们可以分泌多种促血管新生因子，通过旁分泌或自分泌作用，帮助招募局部成熟内皮细胞并诱导其增殖和生存进而促进血管的生成。晚期内皮祖细胞一般在体外培养 2 周以后出现，具有很强的增殖分化成内皮细胞的能力，能独立形成管型，参与局部血管的生成和延伸。由此看来，所谓的内皮祖细胞实际上包括了多种不同的细胞类型，导致其在体外培养的不同阶段体现不同的生物学功能。不同类型的内皮祖细胞在血管生成中发挥的不同作用也将成为很有意义的研究课题。

内皮祖细胞的鉴定一直是个悬而未决的问题（图 2）。由于内皮祖细胞在干细胞树中所处的位置尚无法确定，在形态上无法与其他细胞区分，缺乏特有的表面标志和缺少定义该独特细胞群的功能分析方法，因而分离、纯化、鉴定内皮祖细胞具有一定的难度。有很多措施被用来协助分离和定量内皮祖细胞，可简单分为两种方法：在体外黏附生长和采用细胞表面荧光标记抗体后用流动流式细胞仪来分选。就目前所知，没有人可以提供明确特异的细胞表面分子来分离无论是人类或其他脊椎动物体内的内皮祖细胞。在早期研究（1997～2000 年）描述公认的内皮祖细胞，很长一段时间人们采用三种细胞表面标志物阳性的细胞群（$CD34^+$ /$VEGFR\text{-}2^+$ /$CD133^+$）来检测内皮祖细胞数目。实际上，这群细胞含有丰富的造血祖细胞，但没有具体孤立内皮细胞系的前体细胞。然而，$CD34^+$ / $VEGFR\text{-}2^+$ /$CD133^+$ 的细胞和细胞任何标记的组合所定义的细胞群，似乎在许多人类疾病状态的血管生成中起重要作用。但 2001 年 Harraz 等提出了 $CD34^-$ 内皮祖细胞的概念。2002 年，Reyes 等又从成体骨髓中分离出一种 $CD34^-$ / $VEGFR\text{-}2^+$ / $CD133^+$ /VE-cadherin-的多潜能祖细胞。这些细胞在体外经血管内皮生长因子诱导培养可增殖分化为 $CD34^+$ / $VEGFR\text{-}2^+$ /VE-$cadherin^+$ 内皮祖细胞；在体内参与肿瘤的血管新生和创伤愈合，故也被认为是内皮祖细胞的前体细胞。由此可见，内皮祖细胞的表面标记并非单一的，在不同的发育阶段可能表达不同的标记，或者不同来源的内皮祖细胞也可能具有不同的标记，而内皮祖细胞在缺血、缺氧、受伤或肿瘤新生血管的形成其生物学表型的变化很有可能反映了多种疾病的各个方面。

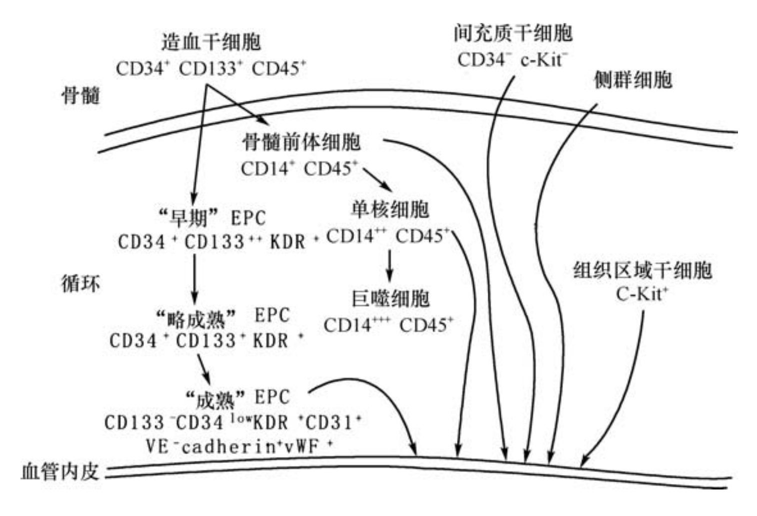


图 2 目前内皮祖细胞的起源和分化的理论认识

除此之外，内皮祖细胞疗法的主要问题在于，各种心血管病危险因素和病理状态对内皮祖细胞的损伤限制了其在患者体内的运用。运用集落刺激因子、基质

细胞衍生因子-1/趋化因子受体4、血管内皮生长因子、红细胞生成素、他汀类药物已证明对内皮祖细胞的数量和功能有保护作用，有望作为细胞治疗的辅助手段共同运用于患者体内。有学者认为，除细胞本身之外，内皮祖细胞分泌的活性因子也可作为体内血管新生疗法的重要来源。如何在患者体内充分发挥内皮祖细胞的“特长”将成为研究重点。

尽管对内皮祖细胞的认识尚不成熟，近年来对内皮祖细胞参与新生血管发展过程中的动态平衡的研究，已经成为加强或抑制新血管形成过程的新战略。依赖于内皮祖细胞的血管新生作用为多种缺血病变提供了一种新的治疗策略，具有广阔的临床应用前景。但是，目前对内皮祖细胞特异性的表面标志仍未完全明了，对其分离纯化、扩增还需进一步的研究。而多种危险因素和病理状态对EPC生物学特性影响的研究尚不透彻，而且内皮祖细胞的血管新生作用除治疗缺血性血管病变以外是否存在潜在危害亦未明确，这些均有待更深入的研究。

参 考 文 献

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science, 275: 964～967

Harraz M, Jiao C, Hanlon HD, et al. 2001. CD34- blood-derived human endothelial cell progenitors. Stem Cells, 19: 304～312

Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. 2003. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. N Engl J Med, 348: 593～600

Hirschi KK, Ingram DA, Yoder MC. 2008. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 28: 1584～1595

Isner JM, Asahara T. 1999. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. J Clin Invest, 103: 1231～1236

Kumar AH, Caplice NM. 2010. Clinical potential of adult vascular progenitor cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 30: 1080～1087

Mund JA, Ingram DA, Yoder MC, et al. 2009. Endothelial progenitor cells and cardiovascular cell-based therapies. Cytotherapy, 11: 103～113

Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, et al. 2002. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. J Clin Invest, 109: 337～346

Yoder MC. 2010. Is endothelium the origin of endothelial progenitor cells? Arterioscler Thromb Vasc Biol, 30: 1094～1103

Zisch AH. 2004. Tissue engineering of angiogenesis with autologous endothelial progenitor cells. Curr Opin Biotechnol, 15: 424～429

撰稿人：陈丰原

匹兹堡大学

人体如何习服适应高原低氧环境

How Do We Acclimate and Adapt to High Altitude Hypoxic Environment

地球周围的大气由于重力产生的压强称为大气压，海拔越高，大气压越低。虽然大气中各种气体成分的百分含量不受海拔高度变化的影响，但随着海拔高度增加，大气中各种气体成分所产生的分压降低，其中由氧产生的分压（氧分压）也降低。也就是说，随着海拔的增高，大气中氧分压降低，肺泡气中的氧分压也降低，进入血液和红细胞的氧分子减少，血氧含量降低。当平原人进入海拔3000m以上的高原时，进入血液和红细胞的氧分子显著减少，对机体的功能代谢产生一系列影响。

平原人进入高原低压低氧环境后，机体会在器官、组织、细胞和分子水平发生一系列代偿适应性反应，以提高对氧的摄取、运输和利用，这个过程称为“习服”。习服良好者可以在高原低氧环境中正常工作和生活，甚至可以不依赖供氧设备登上珠穆朗玛峰的极端高原低氧环境，习服不良者则发生各种急、慢性高原病，严重者可危及生命。以藏族为代表的高原世居者对高原低氧环境具有与生俱来的良好适应能力，而且这种能力可以遗传给下一代，称之为“适应”。

那么，人体是如何习服适应高原低氧环境的呢？这是高原医学研究的核心问题。因为，人体对高原环境习服适应的水平，不仅是决定高原病发生发展的重要因素，同时也是决定健康水平、生活质量和劳动能力的关键所在。为了寻找促高原习服措施，必须弄清这一重要的科学问题。目前认为，人体对高原低氧环境的习服适应是在神经内分泌系统的调控下，围绕呼吸系统氧的摄取、血液循环系统对氧的运输、组织和细胞对氧的利用三个方面进行调整，使功能代谢达到新的平衡的过程。

（1）呼吸系统：低氧可以反射性引起呼吸加深加快，肺通气量增加，称之为低氧通气反应，其意义在于增加氧的摄入。低氧肺通气反应是一种高原习服适应的形式，平原人进入高原后，肺通气量即刻增加，在数天内达到高峰，随之，通气量逐渐恢复。某些高原世居者，尤其是南美人，其肺通气量较低。也就是说，随着高原居住时间延长，低氧通气反应逐渐钝化，这种钝化可以降低呼吸肌做功的氧耗。此时，机体主要通过增强氧的运输和利用等方式适应低氧环境。有关低氧通气反应的机制尚需要深入研究。低氧可引起肺血管收缩，有利于维持缺氧肺

泡的通气-血流比例，具有一定的代偿意义。但强烈的肺血管收缩可引起肺动脉压力过度升高，是肺水肿发生的重要机制。有关肺血管收缩的机制尚不清楚。目前认为除了神经体液因子的作用之外，低氧可以直接作用于血管平滑肌细胞，通过复杂的信号转导途径引起收缩。关于钾离子通道、钙信号、RhoA 信号等的作用是当前的研究热点。长期慢性低氧可引起肺血管结构改建，表现为无肌型血管肌化，血管壁增厚，管腔狭窄，血管硬化，形成稳定的肺动脉高压，增加右心负荷，导致高原心脏病。高原低氧引起肺血管结构改建的机制也是研究的热点之一。高原世居者肺动脉压呈轻度升高或不升高，高原牦牛、高原鼠兔等土生动物的肺循环呈低压和低阻状态。可见高原适应者低氧性肺血管收缩反应钝化，有关其发生机制尚需深入研究。

(2) 血液循环：慢性低氧引起红细胞增多，运氧能力增强，是高原习服的重要机制。肾脏产生的红细胞生成素（EPO）是红细胞生成的主要调控因子，通过与 EPO 受体结合，促进红细胞增生和血红蛋白合成。缺氧时 EPO 及 EPO 受体的表达调控和作用机制是研究热点。非 EPO 途径在缺氧引起红细胞增多中可能也发挥重要作用，值得深入研究。血红蛋白与氧的亲和力改变在高原习服适应中具有重要作用。牦牛、鼠兔等高原土生动物的血红蛋白氧亲和力较高，携氧能力强。但是究竟是由于血红蛋白的修饰还是变异所致？机体是如何形成这种高氧亲和力血红蛋白的？这些问题均值得深入研究。毛细血管密度增加可缩短氧从毛细血管向细胞弥散的距离，是对高原低氧习服适应的重要机制。慢性缺氧动物的大脑皮质、心肌和视网膜等的毛细血管数目增多。缺氧引起毛细血管新生的机制不明。从血管生长因子、生长因子受体等的表达、信号转导和功能调控等方面研究血管新生的机制是当前的趋势。

(3) 组织、细胞氧利用能力：在高原习服过程中，为适应环境中氧分压的变化，机体围绕合理用氧、高效用氧、节约用氧等方面，对能源物质的选择性利用进行调整。代谢调整是机体习服适应高原的重要环节，过氧化脂质体增殖激活受体、腺苷酸活化蛋白激酶、缺氧诱导因子，以及脂肪酸、糖代谢过程中的关键酶的表达量、活性等的变化成为代谢调整的关键点。线粒体是组织、细胞利用氧的关键场所，线粒体的数量、结构、功能改变是机体低氧习服适应的重要机制。线粒体是半自主细胞器，其功能由线粒体基因组和核基因组共同决定，在基因和分子水平上研究线粒体功能的变化和机制是当前的前沿和热点。人体对高原低氧环境的习服适应是多个系统综合作用的结果，呼吸、循环和血液系统的变化分别在习服的某一阶段发挥作用。组织、细胞对氧、能源物质和能量物质的利用效率可能是决定高原习服适应最为关键的因素。

尽管目前对高原习服适应的机制进行了较多研究，但是由于参与高原低氧习服适应反应的代谢途径、细胞信号途径、遗传学与表观遗传调控环节在时间、空

间上均显示出十分复杂的特性，因此这一问题成为亟待解决的科学难题。从遗传学的角度，围绕氧感知，氧摄取、运输、释放，以及氧利用这一轴线，进行高原世居人群与平原人群、高原移居者中习服人群与高原病患者之间的比较研究是解决这一问题的突破口。最近，对高原世居者的遗传适应机制研究取得了突破性进展。解决这一科学难题对提高人类在高原极端环境的生存能力、提高高原居民的健康水平、扩展人类的生存空间都具有非常重要的意义，对深入认识众多缺氧相关性疾病和寻找有效的防治措施也具有重要的科学意义。

参考文献

高钰琪. 2005. 高原军事医学. 重庆:重庆出版社,221～231

Aggarwal S, Negi S, Jha P, et al. 2010. EGLN1 involvement in high-altitude adaptation revealed through genetic analysis of extreme constitution types defined in Ayurveda. Proc Natl Acad Sci USA, 107(44):18961～18966

Julian CG, Wilson MJ, Moore LG. 2009. Evolutionary adaptation to high altitude: a view from in utero. Am J Hum Biol, 21(5): 614～622

Luo Y, Gao W, Gao Y, et al. 2008. Mitochondrial genome analysis of Ochotona curzoniae and implication of cytochrome c oxidase in hypoxic adaptation. Mitochondrion, 8(5～6): 352～357

Simonson TS, Yang Y, Huff CD, et al. 2010. Genetic evidence for high-altitude adaptation in Tibet. Science

Stobdan T, Karar J, Pasha MA. 2008. High altitude adaptation: genetic perspectives. High Alt Med Biol, 9(2): 140～147

Storz JF. Moriyama H. 2008. Mechanisms of hemoglobin adaptation to high altitude hypoxia. High Alt Med Biol, 9(2):148～157

Tan XL, Zhai Y, Gao WX, et al. 2009. p300 expression is induced by oxygen deficiency and protects neuron cells from damage. Brain Res, 1254: 1～9

Tansey EA. 2008. Teaching the physiology of adaptation to hypoxic stress with the aid of a classic paper on high altitude by Houston and Riley. Adv Physiol Educ, 32(1): 11～17

Yi X, Liang Y, Huerta-Sanchez E, et al. 2010. Sequencing of 50 human exomes reveals adaptation to high altitude. Science, 329(5987):75～78

撰稿人：高钰琪　黄　珹

第三军医大学

人体细胞是如何进行氧感知的

How to Sense Oxygen by Human Cells

氧参与机体多种生物化学反应，是细胞合成ATP所必需的物质。20世纪早期，人们就研究了动物和人类组织、细胞对环境氧浓度变化的应答反应，发现机体存在着氧感受器以及相应的低氧反应信号途径。例如，在颈动脉体、延髓腹外侧存在氧感受器，可以感知血液中氧分压变化，并通过神经内分泌系统调控肺通气。最近的研究结果表明，除了此种“系统氧感知途径”之外，哺乳类动物的细胞都可以感知其所处微环境中氧的变化，即细胞中存在氧感受器，它是细胞对缺氧反应的第一环节。有关细胞内氧感受器的本质、氧感受机制和信号转导及整合等成为研究的热点。

血红素蛋白是指一系列含有卟啉环配体的蛋白质，如血红蛋白细胞色素等。血红素蛋白有类似血红蛋白的功能。氧分子结合于血红素分子中央的 Fe^{2+} ，引起 Fe^{2+} 转位到卟啉环平面上。当氧分子解离时，Fe^{2+} 离开卟啉环平面。血红素从氧化到还原过程中发生的构象变化影响血红素蛋白的功能或酶的活性。因此有人认为血红素蛋白是细胞的氧感受器。脯氨酸羟化酶、NAD(P)H氧化酶、可溶性鸟苷酸环化酶、血红素氧合酶等均属血红素蛋白或与之相关联，具有氧感受器的结构基础。为此，形成了多种氧感受学说。①脯氨酸羟化酶（PHD）学说：此学说认为脯氨酸羟化酶（PHD）是细胞的氧感受器。PHD活性的变化是调节缺氧诱导因子（HIF）降解，进而影响葡萄糖转运体、血管内皮细胞生长等许多缺氧相关基因表达的关键环节。脯氨酸羟化反应和乙酰化反应在调节HIF-1α稳态中起着关键性的作用。PHD有3个异构体，即PHD1、PHD2和PHD3。PHD2对低氧尤为敏感，在细胞氧感知过程中扮演着十分重要的角色。脯氨酸羟化反应要求2-酮戊二酸和铁元素作为辅助因子，铁螯合剂和取代剂（如镉、锰、镍等）可上调HIF-1α表达，进而模拟低氧效应。通过RNA干扰技术特异性下调内源性PHD表达，在常氧状态下可稳定和激活HIF-1α表达，使HIF-1α水平增高，进而诱导出多种缺氧反应。②NAD(P)H氧化酶复合物学说：近年来NAD(P)H氧化酶假说在细胞氧感受机制中被广泛接受。胞膜上NAD(P)H氧化酶与其他多种氧化酶形成复合体。在常氧条件下，由NAD(P)H所脱下的电子迅速传递给氧分子，产生超氧阴离子，在细胞浆中形成一种相对高的氧化状态。超氧阴离子歧化生成过氧化氢，导致活性氧(ROS)增加，在含有铁离子的蛋白质分子上引

起费通反应，诱导此蛋白质专一性氧化。这一模型要求 NAD(P)H 氧化酶的催化亚基在氧含量正常的情况下能够持续地激活该系统。在低氧条件下，氧含量的减少将引起这一系统电子转运率的降低，由此降低 ROS 的产生速率，导致细胞内环境处于一个相对还原性的状态。活性氧的产生随着微环境中氧浓度的变化而变化，因而具有氧感受器的功能。由于活性氧的产生速率与氧的浓度有关，这就可以解释为什么氧敏感性钾通道的电导系数改变并不需要氧的直接作用。在此氧感受系统中，过氧化氢和超氧阴离子具有第二信使的作用。在低氧肺血管收缩反应中，低氧引起 NAD(P)H 氧化酶系统活性氧产生减少，使肺血管平滑肌细胞浆中的内环境处于一种相对还原性的状态，这一转化抑制了氧敏感性钾通道，并引起膜的除极，导致电压门控性钙通道的开放，钙离子内流，引起平滑肌细胞收缩。③可溶性鸟苷酸环化酶：可溶性鸟苷酸环化酶（soluble guanylate cyclase，sGC）中含有血红素，血红素附近存在氧与 NO 结合区域。当细胞所处微环境中氧分压变化时，sGC 中血红素与氧的结合状态发生变化，一方面，影响 sGC 与 NO 的结合，进而通过 NO 改变其他氧结合蛋白与氧的亲和力；另一方面，影响 GTP 向 cGMP 的转化，进一步通过下游信号产生多种缺氧效应，如血管平滑肌的收缩与舒张等。④血红素氧合酶（hemoxygenase-2，HO-2）：钙敏感性钾通道（calcium-sensitive potassium channel，BK）是一种存在于哺乳类动物组织中受氧调制的重要通道。在颈动脉体，BK 也是控制呼吸的重要通道。HO-2 是通道复合体的一个组成部分，在常氧下能够增强 BK 的活性，抑制 HO-2 的表达则会降低 BK 的活性。低氧对 BK 的抑制依赖 HO-2 表达。对颈动脉体细胞的研究表明低氧对 BK 的抑制作用依赖于 HO-2，说明 HO-2 在控制与氧相关的通道活性时起氧感受器的作用。可见，HO-2 是 BK 的辅助分子，其对氧含量的感受将影响 BK 的活性，进而介导细胞低氧反应，如肺血管的收缩等。另外，HO 介导产生的 CO 也对细胞的低氧反应具有多重调控作用。

不同细胞中氧感受机制可能不同，例如颈动脉体Ⅱ型细胞对氧的感知主要靠离子通道复合体，改变细胞膜电位，进而形成动作电位，引发神经反应。在血细胞如白细胞，主要以 NADPH 氧化酶复合物为氧感受器。血管内皮细胞、某些肿瘤细胞则主要以脯氨酸羟化酶进行氧感受。一种细胞中可存在多种氧感受机制，一种氧感受机制也可存在于不同细胞中。

但是，目前尚没有一种细胞氧感受假说可以解释一切细胞低氧反应。还有哪些分子是氧感受器？氧感受器的结构基础是什么？氧感受器下游的信号通路是什么？各通路在不同缺氧时间、不同缺氧程度时的调整与协同是如何进行的？另外，细胞氧感受器往往不仅可以感受氧含量的变化，还会感受到其他小分子（如 CO、NO）的变化，各种小分子在氧感受器内如何修饰并改变氧感受分子的分子构象？这些构象如何影响分子的功能？各种小分子对氧感受分子的调控如何协

同？这些问题使得细胞氧感受的机制成为当今科学难题。将来可利用分子构效关系创新性理论研究氧感受分子的构效关系，并以此为突破口研究下游的信号转导系统。另外，结合数学、物理学的最新成果，利用网络理论、模糊理论等对氧感受分子内的各小分子变构作用的协同关系以及氧感受分子下游信号途径的相互配合进行系统研究，也是将来解决这一科学难题的另一突破口。弄清细胞氧感受的实质，对于全面揭示细胞低氧损伤、适应的机制及构建针对性的抗缺氧措施等具有十分重要的理论意义和应用价值。

参考文献

高钰琪.2006.高原病理生理学.北京:人民卫生出版社,33～42

Bunn HF,Poyton RO.1996.Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia.Physiol Rev,76(3):839～885

Huang SH, Rio DC,Marletta MA.2007.Ligand binding and inhibition of an oxygen-sensitive soluble guanylate cyclase, Gyc-88E, from drosophila.Biochemistry,46(51):15115～15122

Jones RD,Hancock JT,Morice AH.2000.NADPH oxidase: a universal oxygen sensor? Free Radic Biol Med,29(5):416～424

Kaelin WG.2005.Proline hydroxylation and gene expression.Annu Rev Biochem,74:115～128

Leite RB,Brito AB,Cancela ML.2008.An oxygen molecular sensor, the HIF prolyl 4-hydroxylase, in the marine protist Perkinsus olseni.Protist,159(3):355～368

Lopez-Barneo J,Ortega-Saenz P,Pardal R,et al.2009.Oxygen sensing in the carotid body. Ann N Y Acad Sci,1177:119～131

Porwol T,Ehleben W,Brand V,et al.2001.Tissue oxygen sensor function of NADPH oxidase isoforms, an unusual cytochrome aa3 and reactive oxygen species.Respir Physiol,128(3):331～348

Wang D,Youngson C, Wong V,et al.1996.NADPH-oxidase and a hydrogen peroxide-sensitive K^+ channel may function as an oxygen sensor complex in airway chemoreceptors and small cell lung carcinoma cell lines. Proc Natl Acad Sci USA, 93(23):13182～13187

Williams SE, Wootton P,Mason HS,et al.2004.Kemp, hemoxygenase-2 is an oxygen sensor for a calcium-sensitive potassium channel.Science,306(5704):2093～2097

撰稿人：高钰琪　黄　珹

第三军医大学

血管内皮修复机制

Mechanisms of Endothelial Repair

血管内皮细胞是血液和血管之间的屏障，参与调节机体自身稳态、血管张力、血管通透性、血液凝固、炎症和免疫反应等重要的生理和病理过程。而动脉粥样硬化（atherosclerosis，AS）的危险因素作用于内皮细胞后，影响内皮的正常功能，引起内皮功能失调和内皮损伤，导致体内的动态平衡失控，引起 AS 病变发生发展。一般认为内皮修复主要有两种方式：成熟内皮细胞更新和迁移，干祖细胞分化为内皮细胞参与修复。对于内皮修复机制的阐释，有助于从不同的角度提高其修复效率，从而预防或改善 AS 的病理过程。

首先，成熟内皮细胞通过自我更新代替受损内皮。体内内皮细胞的更新速度受到血流动力学和危险因素等影响。不同部位的内皮细胞更新速度不同，抗 AS 部位的内皮寿命约为 12 个月，而 AS 易发区的内皮寿命仅为几周。多种因素可影响内皮细胞增殖、凋亡和迁移，进而影响体内的内皮化修复。例如血管生长因子（VEGF、FGF）和药理学试剂（血管紧张素转化酶抑制剂 ACEI、Statin、雌激素）可促进体内的内皮迁移，而危险因素如高同型半胱氨酸血症则抑制内皮细胞迁移修复。内皮化修复的分子和细胞机制尚待进一步研究，例如在电凝模型中，内皮细胞和内皮下的平滑肌细胞等支持细胞全部损伤，但内皮细胞仍可发生迁移等内皮化修复，内皮细胞与支持细胞的相互作用是否与内皮化修复相关？无内皮覆盖区域的平滑肌增殖更为活跃，引起内膜增厚血管狭窄，目前此现象的调节机制尚不清楚。此外，研究认为，循环血中存在少量增殖活跃的内皮细胞，可参与损伤修复过程，但是这些内皮细胞的来源尚无定论，可能为干祖细胞分化成熟的内皮细胞或血管壁内皮细胞脱落入血。

其次，干祖细胞因其分化潜能，在治疗心血管疾病中具有应用前景而受到重视。“干细胞”和“祖细胞”常用于描述同一类细胞：可分化为多种类型以代替死细胞或修复受损组织的细胞。而“内皮祖细胞”（endothelial progenitor cell，EPC）常代表可以分化为内皮细胞的一个多种来源的细胞群的统称。多种干祖细胞具有 EPC 潜能，例如骨髓单个核细胞、间充质干细胞、骨骼肌成肌细胞、脂肪干细胞、血液内皮集落形成细胞，以及脾脏、小肠、肝脏、血管外膜等组织中的干祖细胞等。EPC 需具有内皮成血管等功能特性和特异性的结构蛋白表达，其中标志蛋白是识别干祖细胞的关键，但目前尚无 EPC 的明确标志，多数认同

的观点是具有两个以上的阳性标志蛋白为 EPC，如人的 CD34/CD133 和 VEG-FR2，小鼠的 CD34/c-kit/Sca-1 和 Flk-1。

内源性 EPC 参与内皮修复的过程包括：机体缺血等应激反应产生细胞因子，引起骨髓等组织中干祖细胞激活。在这个动态过程中，EPC 分化为内皮细胞，分化受到多种微环境的影响。例如，层流可以通过 Flk-1-PI3K-Akt-HDAC3-p53-p21 途径，促进 EPC 分化；成熟内皮细胞与外周血的单个核细胞共同培养，可促进单个核细胞向内皮表型分化。参与 EPC 分化的信号机制复杂，Indian hedgehog（Ihh）、bone morphogenic protein 4（BMP4）、碱性成纤维生长因子（bFGF）、血管内皮生长因子（VEGFA）等均可调节其分化过程。目前，EPC 分化研究是科研中的热点：骨髓中干祖细胞与其他组织中干祖细胞的关系，干细胞在 Niche 中的维持和分化动态平衡，影响分化的信号分子及其受体的相互作用，血液中 EPC 与疾病的诊断和预后的关系等均是研究关注的焦点。

根据上述内皮损伤修复机制，某些治疗干预措施可有效治疗 AS 性疾病。但是这些干预手段的效果，在某些条件下往往是有限的，例如长期疾病或衰老状态，对内源性内皮细胞和 EPC 功能改善的程度有限。但是外源性给予 EPC 等细胞治疗，对于心肌梗死、慢性心肌缺血和外周血管疾病等具有明显的促进血管新生和改善心血管功能的效果。临床前研究提示了细胞治疗的良性应用，目前已进入临床试验阶段。例如，体外条件下，对 EPC 进行基因治疗或药物处理提高 EPC 功能后，再回输体内，这种自体细胞治疗方式避免了异体免疫反应和全身用药的副作用；对成体分化成熟细胞进行基因干预，诱导成为多潜能干细胞后，再进行定向分化的诱导式多潜能干细胞（induced pluripotent stem cell，iPS）技术和人胚胎干细胞技术，解决了自体 EPC 来源数量有限的问题；内皮祖细胞、心肌干祖细胞或支持细胞等两种以上干祖细胞混合后应用，可互相促进，提高单一细胞群的应用效果。虽然科学家对干祖细胞治疗怀有极大的期望，但是距离临床应用尚有很多需解决的问题。例如，目前的临床试验结果，与临床前动物试验的积极疗效相比，治疗效果降低。细胞治疗与促分化或血管新生的细胞因子共同治疗是否可提高疗效？分化程度低的干祖细胞，如 $CD34^+$ 骨髓细胞等对疾病的改善效果较好，是否由于其异质性可分化为多种细胞相互促进？其不同方向分化的比例和调控机制的研究将有助于个体化治疗。iPS 技术的诱导分化尚无统一方法，如何标准化 iPS 技术可完全解决细胞治疗的供源问题？

综上所述，心脑血管病的发生源于动脉硬化引起的血管堵塞或破裂。动脉硬化病变起始于血管内皮的损伤。很多因素（如吸烟、高血脂等）可以引起内皮损伤。如果损伤的内皮得以修复血管将不发生病变，但多数情况下内皮并不能完好地修复。虽然近期的研究发现血液中的干细胞参与内皮的修复，但内皮修复的机制尚不完全清楚。如果清楚地了解了内皮修复的机制，则可设计药物以促进内皮

修复或用于细胞治疗的方法。也就是说，解决了内皮修复的问题即可在很大程度上预防心脑血管病的发生并有效地诊断和治疗心血管疾病。

参考文献

Adams B, Xiao Q, Xu Q. 2007. Stem cell therapy for vascular disease. Trends Cardiovasc Med, 17(7): 246～251

Choi KD, Yu J, Smuga-Otto K, et al. 2009. Hematopoietic and endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells. Stem Cells, 27(3): 559～567

Foteinos G, Hu Y, Xiao Q, et al. 2008. Rapid endothelial turnover in atherosclerosis-prone areas coincides with stem cell repair in apolipoprotein E-deficient mice. Circulation, 117(14): 1856～1863

Hu Y, Davison F, Zhang Z, et al. 2003. Endothelial replacement and angiogenesis in arteriosclerotic lesions of allografts are contributed by circulating progenitor cells. Circulation, 108(25): 3122～3127

Kumar AH, Caplice NM. 2010. Clinical potential of adult vascular progenitor cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 30(6): 1080～1087

Ross R. 1986. The pathogenesis of atherosclerosis-an update. N Engl J Med, 314(8): 488～500

Xu Q. 2006. The impact of progenitor cells in atherosclerosis. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 3(2): 94～101

Xu Q. 2008. Stem cells and transplant arteriosclerosis. Circ Res, 102(9): 1011～1024

Xu Q. 2009. Disturbed flow-enhanced endothelial turnover in atherosclerosis. Trends Cardiovasc Med, 19(6): 191～195

Zampetaki A, Kirton JP, Xu Q. 2008. Vascular repair by endothelial progenitor cells. Cardiovasc Res, 78(3): 413～421

撰稿人：徐清波　白　雪

北京大学

肿瘤的良恶性鉴别

Differentiation Between Benign and Malignant Tumors

1. 鉴别的意义

肿瘤，尤其是恶性肿瘤是一类严重影响人类健康的常见病。众所周知，区分一个肿瘤的良恶性有着广泛的社会意义：医生据此决定具体的治疗方案、评估患者的预后，社会要动用不同的资源投入。把恶性肿瘤误诊为良性，将误导临床医师执行错误的治疗和随访方案，其结果往往是患者错过最佳治疗机会，甚至导致本可避免或延后的死亡。反之，把良性肿瘤误诊为恶性，则将导致过度治疗，对患者产生明显的精神影响，甚至完全改变患者今后的人生轨迹。

2. 鉴别的标准

肿瘤良恶性鉴别的标准是明确的，即对患者的危害程度，这种危害主要是指对患者生命的影响。然而，要对一个具体的肿瘤病例明确其良恶性是非常困难的，因为我们不可能预知整个病情的进展，临床诊断和处理的不确定性也使肿瘤良恶性鉴别更加困难重重。应该说肿瘤良恶性鉴别的最大难点是在医学上还没有一个界定肿瘤良恶性的客观标准。

3. 肿瘤良恶性区别的相对性和研究新进展

目前医学界对肿瘤良恶性的诊断是在总结了前人对各种肿瘤诊治经验基础上的一种估计，或者叫预测。具体的区别要点就是教科书上的七条：肿瘤组织分化程度、生长方式、生长速度、核分裂象、继发改变、转移和复发、对机体的影响。完成这七条评估要求临床医师、病理医师和医学影像学医师的通力合作，其中病理医师发挥了核心作用，这也正是肿瘤的病理诊断被誉为“金标准”的原因。

七条区别点中肿瘤的分化程度是最为重要的一条，但其往往只是在形态学上的反映，即与其来源组织的相似性，但形态表现与生物学特性常常并不完全符合。如甲状腺的滤泡性腺瘤和滤泡癌可以具有同样的排列方式和细胞形态，但只要肿瘤细胞侵犯血管或穿越包膜侵及周围正常甲状腺就诊断为癌。

在肿瘤的生长方式上良性肿瘤呈膨胀性生长，周围常有一个主要由纤维组织构成的包膜，而恶性肿瘤往往呈浸润性生长，与周围组织无明确的界限。但有不少良性肿瘤，特别是间质来源的良性肿瘤，如血管瘤多无包膜，呈浸润性生长。

肿瘤对机体的危害受到诸多因素的影响，生长在要害部位的良性肿瘤，如颅

内的良性肿瘤，常可危及患者的生命；好发于老年人的皮肤基底细胞癌很少转移，以致有人称之为基底细胞瘤。而一般均认为是恶性的淋巴瘤，其中也有些呈惰性经过，临床可有数十年的病程，生物学特征接近良性。

即使大家认为具有肯定意义的转移，也有如何认识的问题：一些良性肿瘤在外周血管或淋巴管中可以找到肿瘤细胞，甚至正常怀孕生产后，产妇肺血管内可以见到绒毛结构，由于这些没有继发瘤的形成不能被看做转移；有些部位，特别是头颈部，淋巴结切片中常可见正常腺体的存在，这可能是胚胎发育过程的一种分布形式，也可称为迷离；而恶性肿瘤也并非一定有转移，有的恶性肿瘤如甲状腺乳头状癌虽然有局部淋巴结的转移，但手术切除后，患者预后仍良好；有些绒毛膜上皮细胞癌临床有转移，经手术切除原发灶并辅助化疗后转移灶也可消失。

至于肿瘤细胞核的分裂象、肿瘤的生长速度、肿瘤的继发改变及有无复发等指标在良恶性肿瘤中都有明显的重叠性，往往只有辅助的参考意义。因此，对具体的病例诊断时上述七条区别要点都是相对的，必须综合分析。

应该明确良恶性肿瘤之间并没有绝对的界线，临床实践发现有的良性肿瘤如不及时治疗，可转变为恶性肿瘤，如结直肠的家族性腺瘤性息肉病随着年龄的增长几乎 100% 发生癌变；膀胱的泌尿上皮乳头状瘤，如完全按照良性肿瘤进行简单的瘤体摘除，则常可以多次复发，并逐渐恶变。相反，好发于儿童的恶性神经母细胞瘤可以随患者的发育成熟而逐渐演变为良性神经节细胞瘤；个别黑色素瘤由于患者机体免疫力增强等原因，可以自动停止生长，甚至完全消退；一定比例的甲状腺乳头状微灶癌，可以在患者因别的原因死亡后做尸体解剖时才偶然发现。

近年来免疫组化和分子生物学技术的应用对许多肿瘤的良恶性鉴别起到很大的推动作用，如免疫组织化学 Ki-67 标记可以反映肿瘤组织的增殖特性，有助于正确评价胃肠间质肿瘤的良恶性；分子生物学技术检测 PAX8/PPARγ 融合基因则有助于甲状腺滤泡癌与其他甲状腺肿瘤的鉴别。

4. 解决难题的方向

首先要建立一个统一的界定肿瘤良恶性的客观标准，最易考虑的是在一定的临床分期和规范治疗（如以临床Ⅰ期、实体瘤单纯局部手术切除不加辅助治疗、非实体瘤一个常规化疗周期治疗）条件下，患者无瘤或带瘤状态有质量生存（无需他人辅助、与正常同龄人相仿）的时间作为考核指标，少于 5 年的为恶性，5～8年的为交界性，大于 8 年的为良性；或者以患者在上述条件下的 5 年生存率定为该肿瘤的恶性潜能来表示其恶性程度。只有明确了标准才能谈得上正确地分类和诊断，当然这要得到大家的认可还有很长的路要走。

目前临床和病理诊断非常明确的良恶性肿瘤要列入上述体系并无太大的困难，但还有许多肿瘤由于诸多因素，要完全列入该体系尚有大量的工作要做：

①首先是要规范诊断、规范治疗，而后要有完备的随访资料的积累，也就是说要重视临床医学研究。②要增加社会对病理专业的认知度，提高病理医师队伍的素质，积极推动免疫组织化学和分子生物学等新技术在肿瘤病理诊断中的应用，不断发现一些新的标志分子，逐渐完善上述体系，并加以推广和标准化。③要扩大宣传，让全社会而不仅仅是让医学界接受良恶性肿瘤鉴别的灰色地带的概念，即无论如何努力总有一些肿瘤无法正确判定其良恶性。这一方面是因为自然界的发展总会不断出现一些新的疾病，另一方面是对疾病的科学认识总有一定的滞后性，更重要的是上述鉴别的基础还不能脱离传统病理形态学的识别，而这种识别在可预见的将来还主要是靠人（病理医师）来完成，而人的认知能力总是有限的，还不能完全排除主观性的干扰。④在肿瘤良恶性鉴别诊断中病理医师的确起到了中坚作用，但正确的诊断还有赖于患者和临床医师提供正确的病史和辅助检查结果。如恶性程度很高的骨肉瘤，如果没有临床和放射检查结果的支持，单纯根据肿瘤的形态学表现几乎无法与骨折后的修复反应（骨痂）相区别。因此，肿瘤良恶性鉴别是一项系统工程，也是一个不断完善、永无止境的过程。

参考文献

Maode Lai. 2009. Intraepithelial Neoplasia. Beijing and Springer：Higher Education Press

Mills SE，Carter D，Greenson JK，et al. 2010. Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology. Wolters Kluwer：Lippincott Williams & Wilkins

Nakamura N，Yamamoto H，Yao T，et al. 2005. Prognostic significance of expression of cell-cycle regulatory proteins in gastrointestinal stroma tumor and the relevance of the risk grade. Hum Pathol，36(7)：828～837

Nikiforov YE. 2008. Thyroid carcinoma：molecular pathways and therapeutic targets. Mod Pathol，21(suppl 2)：S37～S43

Rosai J. 2004. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. st. Louis：Mosby

撰稿人：许祖德[1]　周晓军[2]

1 复旦大学附属华山医院

2 南京军区南京总医院

肿瘤多药耐药——肿瘤化疗失败的关键

Multiple Drug Resistance — A Key Failure of Cancer Chemotherapy

肿瘤，尤其是恶性肿瘤是目前危害人类健康最严重的疾病之一。化学药物治疗（简称化疗）是恶性肿瘤治疗中除手术、放疗以外最重要的手段，但是肿瘤对化疗药物产生耐药成为肿瘤治疗失败的一个重要原因。

1. 多药耐药的提出及其重要性

1970 年，Riedler 和 Reihm 发现某些肿瘤细胞对一种抗肿瘤药物产生耐药性的同时，对结构和作用机制完全不同的其他抗肿瘤药物也会产生交叉耐药性，这一现象即为多药耐药（ multiple drug resistance，MDR）。研究表明，多药耐药又可以分为内在性多药耐药和获得性多药耐药。前者包括消化器官的胃癌、肠癌、肝癌等，呼吸系统的肺癌，泌尿系统的肾癌，以及大脑和中枢神经系统肿瘤；后者包括皮肤癌、乳腺癌、生殖器癌、内分泌肿瘤、白血病和淋巴瘤等。资料显示，每年由肿瘤引发的死亡病例中，90% 以上与肿瘤 MDR 有关。因此，逆转 MDR 刻不容缓！

2. 多药耐药的机制

MDR 的机制较为复杂，主要包括以下几类：

(1) 膜糖蛋白的过表达：目前发现的与 MDR 相关的细胞膜糖蛋白主要包括多药耐药基因 1（mdr1）编码的 P-糖蛋白、多药耐药相关蛋白（MRP）、乳腺癌多药耐药蛋白（BCRP）和肺耐药相关蛋白（LRP）。其中由 P-糖蛋白介导的 MDR 现象发现最早，且为乳腺癌、胃癌、肝癌、结肠癌等多种肿瘤最主要的 MDR 因素，因此又称为经典耐药。

研究表明，P-糖蛋白、MRP 和 BCRP 均属于 ABC（ATP- binding cassette）转运蛋白超家族成员，能利用 ATP 水解释放的能量主动将疏水亲脂性化疗药物转运至细胞外，导致细胞内药物浓度低于杀伤浓度。正常情况下在胃肠道、肝脏、胎盘、血-脑屏障等均少量表达，主要作用为降低上述组织对潜在有毒物质的吸收，从而保护其功能。耐药肿瘤组织中往往出现上述蛋白质过表达，从而使肿瘤细胞产生 MDR。这些膜糖蛋白的过表达可以引起肿瘤细胞对多种化疗药物产生耐药，如多柔比星、长春碱类、紫杉醇、米托蒽醌、VP-16、甲氨蝶呤等。

(2) 肿瘤干细胞与多药耐药：随着对干细胞的深入研究，学者发现肿瘤中存在的一小群未分化或分化较差的细胞，它们既具有自我更新和增殖分化的能力，

又能够抵抗化学治疗和放射治疗，这就是肿瘤干细胞。由于肿瘤干细胞往往高表达膜糖蛋白家族成员，因此学者们推断肿瘤干细胞在肿瘤 MDR 中发挥重要作用。

(3) 其他机制：细胞内一些酶的表达异常，也可能会引起 MDR，如谷胱甘肽-*S*-转移酶（glutathione-s-transferase，GST）、拓扑异构酶Ⅱ（topoisomerase，TopoⅡ）、蛋白激酶 C（proteinkinase C，PKC）、葡萄糖神经酰胺合成酶（glucosylceramide synthase，GCS）等。此外，凋亡相关基因如 bcl-2、p53、CD95、c-myc、ras、fas/apo21、bcr/abl、cerB-2/neu 等的表达异常也被证实与 MDR 相关。

3. 多药耐药的逆转研究进展

自从多药耐药现象被发现以来，学者们就致力于对其逆转的研究。目前主要采用以下几种方法：

(1) 药物治疗：针对不同机制，目前已经发现大量具有逆转作用的化合物。由于 P-糖蛋白（P-gp）在 MDR 中占主要地位，因此目前的逆转剂主要针对 P-gp，且目前已经发展到第三代，如 tariquidar 和 zosuquida 等；除此以外，如针对 GST 的依他尼酸、丁硫氨酸亚砜胺（BSO）等。

我国中药资源丰富，而且许多中药具有抗肿瘤作用，如粉已防碱、槲皮素等被证明具有增加肿瘤细胞对药物敏感性的功能。

(2) 免疫治疗：针对 MDR 的免疫治疗开始于 20 世纪 90 年代初，主要是应用 P-gp 特异性的单克隆抗体与之结合，来影响或阻断 P-gp 的药物转运功能，阻止细胞内化疗药物的外流。MRK16 是目前研究得比较多的 P-gp 单克隆抗体之一，其可以选择性地杀死已产生 MDR 的肿瘤细胞，从而有效地阻断耐药性产生。

(3) 基因治疗：基因治疗是指利用遗传或分子生物学方法将外源基因导入生物体内或人体细胞内，以弥补所缺失的基因或关闭、降低异常基因的表达，从而对疾病进行治疗。

4. 多药耐药逆转的主要难点和突破口

过去 30 余年，专家致力于通过恢复耐药肿瘤对化疗的敏感性以克服 MDR 的研究，虽然取得了一定的成果，但由于多药耐药机制较复杂，仍然存在许多问题：①目前已经在临床应用的药物如 P-gp 的第一代逆转剂维拉帕米，毒性较强，因此限制了其应用；而新型药物如 tariquidar 和 zosuquida 等尚未进行临床试验；中药成分复杂，且目前仅处于基础阶段，大规模临床试验较少，因此目前临床应用的逆转剂较少。②由于 MDR 相关基因在正常组织中也存在，且发挥重要作用，而目前基因治疗并不能准确定位于肿瘤组织，从而限制了其临床应用。③基因调控是一个非常复杂的网络，MDR 的产生是一个多基因参与的复杂过程。因

此单纯针对某一基因的治疗可能会引起其他基因发生改变，其具体结果尚难以预料，这也限制了基因治疗的应用。

肿瘤干细胞的发现对肿瘤研究具有重要意义，肿瘤干细胞中往往存在 MDR 相关基因高表达的细胞群。而这群细胞对化疗药物敏感性极低，这对研究肿瘤细胞 MDR 的发生、发展具有重要启示作用。因此，对肿瘤干细胞耐药机制的研究，可能成为破解 MDR 的突破口。

参考文献

Chaunccy TR. 2001. Drug resistance mechanisms in acute leukemia. Curt Opin Oncol ,13(1):21～26

Fojo T , Bates S. 2003. Strategies for reversing drug resistance. Oncogene ,22(47):7512

Kawabata S , Oka M , Shiozawa K ,et al. 2001. Breast cancer resistance protein directly confers SN-38 resistance of lung cancer cells. Biochem Biophys Res Commun ,280(5):1216～1223

Liu YY , Yu JY , Yin D ,et al. 2008. A role for ceramide in driving cancer cell resistance to doxorubicin. FASEB J ,22 : 2541～2551

Matsuo H , Wakasugi M , Takanaga H ,et al. 2001. Possibility of the reversal of multidrug resistance and the avoidance of side effects by liposomes modified with MRK 216 , a monoclonal antibody to P-glycoprotein. J Control Release ,77 (122): 77～86

Patrawala L , Calhoun T , Schneider-Broussard R ,et al. 2005. Side population is enriched in tumorigenic , stem-like cancer cells , whereas ABCG2^{+} and ABCG2^{-} cancer cells are similarly tumorigenic. Cancer Res ,65(14): 6207～6219

Sandler A , Gordon M , De Alwis DP ,et al. 2004. A phase Ⅰ trial of a potent P-glycoprotein inhibitor , zosuquidar trihydrochloride (LY335979) , administered intravenously in combination with doxorubicin in patients with advanced malignancy. Clin Cancer Res ,10 (10): 3265～3272

Tomris Ozben. 2005. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. FEBS Letters ,580 :2903～2909

撰稿人：张晓芳　周庚寅

山东大学

肿瘤微环境与上皮性恶性肿瘤的发生

Tumor Microenvironment and Epithelial Cancer Development

一直以来，“突变理论”在肿瘤生物学领域占据主导地位，肿瘤被认为是遗传改变积累的结果。但是，人们逐渐意识到肿瘤并非是由单一的肿瘤细胞构成，而是由肿瘤细胞、新生血管、浸润的炎细胞及活化的间质成分组成，肿瘤间质成分在肿瘤发生过程中的作用日益受到重视。

1. 癌相关成纤维细胞

在这些活化间质成分中，成纤维细胞在肿瘤发生和演进中发挥了重要作用，它们通过细胞与细胞间相互接触，促进上皮细胞恶性转化。在非病理条件下，静止期成纤维细胞是结缔组织的主要细胞成分，参与分泌细胞外基质成分；在损伤等因素刺激下，成纤维细胞参与组织损伤后的修复；在创伤愈合过程中，当损伤因素消除后，成纤维细胞由功能活化状态转化为静息状态；而在肿瘤发生过程中，活化的基质成纤维细胞难以逆转为静息期细胞，这和“肿瘤是永不愈合的伤口”的概念相吻合。肿瘤中持续活化的成纤维细胞被称为癌相关成纤维细胞（carcinoma associated fibroblast，CAF）。CAF 在形态上是一种平滑肌样、纺锤形的大梭形细胞。肿瘤细胞和 CAF 如何相互作用呢？研究表明，CAF 能合成和分泌细胞外基质（extracellular matrix，ECM），同时也能分泌降解 ECM 的蛋白酶，改变 ECM 成分，降解基底膜，促进新生血管形成，还可以分泌大量的细胞因子和炎症介质，从而促进肿瘤细胞增生。CAF 分泌的细胞因子如转化生长因子-β（tranforming growth factor β，TGF-β）、血小板生长因子（platelet-derived growth factor，PDGF）、成纤维细胞生长因子 2（fibroblast grwoth factor 2，FGF2）被认为参与了上述生物学效应。最新研究表明，TGF-β 和肝细胞生长因子（hepatocyte growth factor，HGF）能够促进乳腺上皮细胞癌变，这提示 CAF 不仅能促进肿瘤生长和转移，CAF 分泌的细胞因子还能诱导肿瘤发生。

那么，究竟是何种因素导致成纤维细胞演变成癌相关成纤维细胞呢？至今尚无定论。已有的研究表明，一些由免疫细胞、损伤的上皮细胞及肿瘤细胞分泌的生长因子、炎症介质和趋化因子都可能介导了这一演变过程。有文献提出肿瘤细胞能够通过旁分泌一些因子，如 FGF、PDGF、TGF-β、白细胞介素及集落刺激因子等，破坏正常基质结构和内环境稳定，从而促进肿瘤间质的活化，形成有利于肿瘤形成的微环境。而 CAF 又是肿瘤生长因子和蛋白酶的主要来源细胞，这

些因子可以维持肿瘤上皮细胞的生长，这种肿瘤上皮细胞和 CAF 间的反馈作用可能促进了肿瘤的发生发展。

2. 细胞衰老和衰老的成纤维细胞

近年来，研究人员发现，除了活化的间质成纤维细胞之外，“无活性”衰老的成纤维细胞同样可以促进肿瘤附近的上皮细胞生长，这与之前的研究有些自相矛盾。40 多年前 Hayflick 和 Moorhead 最早提出“细胞衰老”这一概念，他们发现一些特定的因素可以诱导正常成纤维细胞的生长停滞。在很长一段时间里，细胞衰老被认为是进行细胞培养时的人为现象。但是，后续的实验表明，细胞衰老可以被各种不同的内部和外部刺激所诱导，包括通过细胞复制周期使端粒缩短（复制衰老）、DNA 氧化损伤、染色体不稳定和接触致癌物质等。因为衰老细胞停止分裂，所以细胞衰老就提供了一个坚实的屏障阻止细胞恶性转化。然而，研究证实间质细胞衰老可以促进邻近上皮性肿瘤的形成，此为肿瘤的研究提供了新思路。在 20 世纪 90 年代初期，人们第一次发现衰老的间质细胞在调节上皮细胞致瘤性方面发挥作用。在这项开拓性研究中，McCullough 等发现把肝癌细胞注入年幼大鼠肝实质内，几乎不能成瘤；而随着宿主动物的年龄增长，这些肿瘤细胞成瘤性增强。类似的报道还发现，早期子宫内膜间质细胞可以抑制子宫内膜上皮细胞的恶性转化，而随着间质细胞的数量增加，其生长抑制潜能逐渐丧失。上述研究表明，随着间质细胞的衰老，肿瘤的微环境由抑制上皮性肿瘤的发生向有利于肿瘤发生的方向转变。此后，大量研究表明细胞衰老能够促进肿瘤发生。Krtolica 等研究发现，在培养的细胞及免疫功能低下的小鼠体内，衰老的、非正常的人类成纤维细胞对于癌前病变的人类皮肤上皮细胞具有显著的致瘤性。由此提供了第一个实验证据证明衰老的间质成纤维细胞可以促进肿瘤的发生。

类似的研究通过使用不同来源（包括前列腺、乳腺、皮肤和卵巢）的人类癌前上皮细胞系，证明衰老的间质成纤维细胞能够促进肿瘤的生长。除了促进肿瘤的形成，衰老的成纤维细胞还参与促进肿瘤新生血管的形成。Copper 等研究发现，在裸鼠体内，肺成纤维细胞能有效地促进上皮细胞分泌血管内皮细胞生长因子（vascular epithelial growth factor，VEGF）。综上所述，衰老的间质成纤维细胞可能通过促进肿瘤细胞增殖和肿瘤血管形成来促进肿瘤发生。

衰老的间质成纤维细胞促进肿瘤形成是癌症发生的重要因素。接下来，科学家感兴趣的是衰老的成纤维细胞如何调节这一效应。大量的研究表明，衰老的成纤维细胞旁分泌的各种信号分子促进了肿瘤形成。2008 年，Campisi 等系统地研究了正常状态、静息状态及衰变的人类成纤维细胞中基因表达谱的变化，同时还检测了一系列衰变的成纤维细胞分泌的信号分子，他们称之为衰老相关分泌表型（senescence-associated secretory phenotypes，SASP），同时证实 SASP 由大量的

炎症介质、趋化因子、生长因子、存活因子和跨膜分子所组成。SASP 本质上是促进炎症发生，并且炎症和免疫调节的促瘤作用已经被公认。由此推断，衰老的间质成纤维细胞在一定程度上通过旁分泌信号分子可以形成促进肿瘤发生的微环境。

CAF 和衰老的成纤维细胞在促进肿瘤的发生中起了非常相似的作用，那么它们是一样的吗？这个问题到目前为止还没有完全阐明，不过仍有一些线索可以提供参考。CAF 和衰老的成纤维细胞有很多的相似性，如都能旁分泌分子、促进新陈代谢、细胞体积增大等。一些研究者认为 CAF 可能是一个模棱两可的术语，它实际上可能与衰老的成纤维细胞或肿瘤部位其他类型的成纤维细胞相互混杂。

3. 存在的问题和研究方向

尽管肿瘤发生中上皮与间质的相互作用逐渐为人们所认识，但还存在一些疑问。除了上述已被确认的分子外，还有哪些其他分子可以在肿瘤上皮与间质之间传递信号呢？在特定的细胞内环境中，炎症反应如何精确调控？上皮细胞如何对抑制增殖和促进增长的不同信号做出相应的反应？CAF 或衰老的成纤维细胞是否可能被消除从而抑制肿瘤？如果可行，是否会产生一些严重的副作用而不是抑制肿瘤的形成？关于这些问题的深入理解不仅能促进肿瘤生物学的进展，而且为抗肿瘤治疗提供新的可能性。由于慢性炎症与许多上皮性肿瘤（如胃癌、肝癌及结肠癌）的发生发展密切相关，所以如果能在早期控制慢性炎症和相关组织细胞的衰老，这将对降低肿瘤的发生具有重要意义。

参 考 文 献

Coppé JP, Kauser K, Campisi J, et al. 2006. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. J Biol Chem, 281(40): 29568～29574

Coppé JP, Patil CK, Rodier F, et al. 2008. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. PLoS Biol, 6(12): 2853～2868

Kalluri R, Zeisberg M. 2006. Fibroblasts in cancer. Nat Rev Cancer, 6(5): 392～401

Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, et al. 2001. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. Proc Natl Acad Sci USA, 98(21): 12072～12077

Mueller MM, Fusenig NE. 2004. Friends or foes-bipolar effects of the tumour stroma in cancer. Nat Rev Cancer, 4(11): 839～849

Shan W, Yang G, Liu J. 2009. The inflammatory network: bridging senescent stroma and epithelial tumorigenesis. Front Biosci, 14: 4044～4057

Yang G, Rosen DG, Zhang Z, et al. 2006. The chemokine growth-regulated oncogene 1 (Gro-1)

links RAS signaling to the senescence of stromal fibroblasts and ovarian tumorigenesis. Proc Natl Acad Sci USA ,103(44):16472～16477

撰稿人：刘劲松[1]　单薇薇[1]　冯振卿[2]
1 得克萨斯大学
2 南京医科大学

外源干细胞能否在肝脏再殖中产生具有正常时空特性的组织结构

Exogenous Stem Cells in the Repopulated Liver Generate the Tissue Structure with Normal Temporal and Spatial Characteristics

1. 背景

干细胞生物学的研究表明，干细胞具有以不对称分裂为特征的自我更新能力，也具有重新形成干细胞巢、分化产生特定功能细胞、重建相应组织的基本生物学特性。在体外实验研究中，胚胎干细胞和肝干细胞可分化为肝前体细胞，并进一步分化为成熟的肝细胞与胆管细胞。在细胞移植实验中也观察到外源的干细胞对损伤肝脏的再殖，使受损肝脏在结构和功能上得到有效的恢复。这些进展充分显示了利用干细胞对人类肝脏疾病，尤其是终末期肝病进行临床治疗的可能性。

2. 科学意义

实验研究表明，移植外源干细胞可以再殖受体肝脏，补充损伤缺失的肝细胞，但胆管细胞与间质细胞的有效再生尚未见报道。从临床应用的角度来看，不仅需要补充肝细胞数量的缺失，也要能够分化产生胆管细胞及各种间质细胞，更重要的是植入干细胞能否在肝内原位增殖分化成正常肝小叶的解剖生理结构，也就是我们提出的能否产生具有正常时空特性的组织结构。这一点不仅对于肝功能的正常恢复至关重要，而且为再殖扩增的细胞提供了一个正常的微环境，既保证其长期存活，又避免远期的致瘤风险。

对于外源干细胞在肝脏再殖中产生具有正常时空特性的组织结构的研究，使我们期待在不久的将来，干细胞移植能成为终末期慢性肝病或急性肝衰竭的一个有效治疗手段，从而使肝移植所面临的供体肝脏缺乏问题得到解决。

3. 最新进展

早在 20 世纪 30 年代，就开始有关于哺乳动物肝脏具有强大再生修复能力的实验证据。一个典型的例子是，Higgins 和 Anderson（1931）采用外科手术的方法将大鼠肝脏切除 2/3 后，其剩余的肝组织可在一周内恢复到原来肝脏的大小，并发挥其正常的功能。而关于这一现象的细胞生物学基础，也很早就开始有所认识。最初是 Farber 等（1956）在使用致癌剂处理大鼠后，发现其肝组织的门管区内出现体积较小的圆形非实质细胞，并将其称为卵圆细胞（oval cell）。在后来

的陆续研究中，逐渐证明了卵圆细胞是成体肝脏在病理状态下所出现的肝干细胞，并可参与肝脏损伤的修复。例如，Wilson 等（1958）通过对小鼠严重营养性肝损伤的研究发现，末端胆小管的非实质细胞可以增殖分化成成熟的肝细胞，并能形成新的小叶间胆管；Evarts 等（1987）采用肝损伤和放射性核素标记示踪的方法，在 Farber 的卵圆细胞模型中证明了卵圆细胞具有分化为肝细胞和胆管细胞的能力。特别是在近几年中，开始有了移植的外源细胞（包括直接分离的肝实质细胞和体外培养的干细胞等）参与肝脏损伤修复的实验研究。例如，Wang 等（2002）在基于延胡索酸乙酰乙酸脱氢酶（fumarylacetoacetate hydrolase，FAH）基因剔除小鼠的肝脏损伤模型中证明了成体小鼠骨髓细胞参与损伤肝脏的修复；国内胡以平实验室（2006）从倒千里光碱（retrorsine）处理的成体小鼠肝脏中分离培养了卵圆细胞，并在体外分化实验中证明了这种细胞具有肝向和胆向分化的潜能，进而通过移植实验证明了这种外源的培养细胞可以参与损伤肝脏的结构修复，其来源的扩增细胞并可表现出成熟肝细胞的基本特性。在此基础上，该实验室也证明了体外培养的人骨髓间充质干细胞、小鼠胚胎干细胞诱导分化的肝前体细胞，以及从肝脏（包括胚胎小鼠肝脏、成体小鼠肝脏和成人肝脏）中分离的肝实质细胞都具有不同程度的参与肝脏损伤修复的能力。除此之外，近年中也陆续出现了一些在动物模型中通过肝实质细胞移植以矫正代谢缺陷和救治急性肝坏死的例子。

4. 主要难点

肝干细胞及其相关研究的这些进展，提示了对人类肝脏疾病进行细胞治疗的可能性，以及治疗性细胞来源的多样性。然而，在目前所有的移植实验中，尽管所植入的细胞可以从结构上参与肝脏的修复，而且可以分裂增殖，甚至其增殖所产生的细胞群体可以达到整个肝脏的 80% 以上。然而，在发生了损伤修复的肝组织中，源于所植入细胞的后代细胞群体中只有肝细胞，并未发现胆管细胞或胆管的形成，以及各种间质细胞的产生。如果从临床实际应用的角度考虑，要实现人类肝脏疾病的细胞治疗，还有许多问题需要解决。因为在技术上至少应能做到，所植入的外源细胞不仅能够分化产生成熟的肝细胞，而且也要能够分化产生胆管细胞及其各种间质细胞，并能够控制其各种细胞数量的比例匹配，乃至能形成具有正常时空特性的解剖结构（如肝小叶）。与此同时，还要能够避免所植入细胞远期致瘤的可能性。

5. 展望

活体中原位的肝干细胞可以分化为肝细胞和胆管细胞，以及培养的肝干细胞在体外诱导分化的条件下具有肝向和胆向分化潜能。从这些实验证据来看，外源移植的肝干细胞或相关细胞在特定的损伤肝脏中也应该具有肝向和胆向分化的潜能，乃至形成具有正常时空特性的解剖结构，但在相当多的实验研究中却都没有发现这样的现象。由此看来，植入活体损伤肝脏中的干细胞（包括其他种类的外

源细胞）的分化命运与活体损伤肝脏中原位出现的肝干细胞（即卵圆细胞或其前体细胞）的分化命运可能是有差异的。就现有的知识来看，这种差异的存在确实是可能的，显而易见的影响因素就有许多。例如，所植入细胞本身的因素、损伤肝脏中局部微环境的因素，以及所植入细胞与所处微环境之间相互作用的因素等。很显然，要认识外源移植细胞在损伤肝脏中的再殖行为（即分化细胞类型的匹配、组织结构的完整、功能活动的调控及肿瘤的避免等）调控机制，可能首先应该对“活体中原位的肝干细胞（卵圆细胞或其前体细胞）的时空行为及其与局部微环境之间相互作用”有充分的认识。而目前仅有一些初步的关于肝干细胞在生理和病理状态下的存在、分子标志及增殖与分化特性等方面的认识。随着干细胞生物学新近发展中关于活体组织中干细胞干性维持、静息状态和活化状态的转化、增殖与分化及微环境等研究的发展，肝干细胞生物学的知识体系可能会很快地丰富和发展。但可以预料的是，要真正实现“外源移植细胞在损伤肝脏中的再殖行为”的人为干预，除需要大量的肝干细胞生物学的基础知识的积累外，可能更需要的是一个更为有效的研究策略，因为肝脏本身有其结构上与功能上的特殊性和复杂性。至于这个研究策略是什么，则需要这一领域的研究者去思考。

参考文献

Evarts RP, Nagy P, Marsden E, et al. 1987. A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver. Carcinogenesis, 8(11):1737～1740

Farber E. 1956. Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylamino-fluorene, and 3′-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. Cancer Res, 16(2): 142～148

He ZY, Zhang HB, Zhang X, et al. 2010. Liver xeno-repopulation with human hepatocytes in Fah$^{-/-}$ Rag2$^{-/-}$ mice after pharmacological immunosuppression. Am J Pathol, 177(3):1311～1319

Li WL, Su J, Yao YC, et al. 2006. Isolation and characterization of bipotent liver progenitor cells from adult mouse. Stem Cells, 24(2):322～332

Tao XR, Li WL, Su J, et al. 2009. Clonal mesenchymal stem cells derived from human bone marrow can differentiate into hepatocyte-like cells in injured livers of SCID mice. J Cell Biochem, 108(3): 693～704

Wang X, Montini E, Al-Dhalimy M, et al. 2002. Kinetics of liver repopulation after bone marrow transplantation. Am J Pathol, 161(2):565～574

Wilson JW, Leduc EH. 1958. Roles of cholangioles in restoration of the liver of the mouse after dietary injury. J Pathol Bacteriol, 76(2): 441～449

撰稿人：胡以平　谢东甫

第二军医大学

大分子的细胞内转运

Transport of Biomacromolecules in Cell

核酸、蛋白质等生物大分子在细胞内的转运过程是非常复杂的。就一个分泌蛋白而言，它由细胞合成，最终会排出细胞之外。分泌蛋白为什么不会进入细胞核或其他细胞器而分泌到细胞外呢？这显然是一个精密调控的过程。Gunter Blobel 提出了分泌蛋白的信号假说，揭示了分泌蛋白由于存在信号肽序列而导致其进入内质网合成并且被分泌出去，他因此获得 1999 年诺贝尔生理学/医学奖。蛋白质的定向转运取决于其自身所携带的信号序列也成为人们普遍接受的事实。

随着研究的不断进展，人们的认识也逐步深入，目前的观点认为，细胞内蛋白质和核酸的转运均需要信号序列的存在。不仅是附着在核糖体上合成的分泌蛋白、膜蛋白和溶酶体蛋白均存在决定其定向转运的信号序列，而且游离核糖体合成的细胞核蛋白、线粒体蛋白和过氧化物酶体蛋白也存在定向转运的信号序列。这种序列不仅是线性的信号序列，还可能是一种具有立体构象的信号序列，称为信号斑。除了信号序列，蛋白质靶向的细胞器上还应存在识别信号序列的信号识别装置。如果把信号序列当做邮件地址栏，信号识别装置就类似接收邮件的邮箱。

蛋白质在细胞内的转运方式主要有门控运输、跨膜运输和膜泡/囊泡运输三种方式。门控运输主要是核酸或蛋白质通过核孔复合物出核和入核的过程，核转运蛋白（karyopherin），如内输蛋白（importin）和外输蛋白（exportin）是帮助蛋白质和 RNA 进出细胞核的蛋白质。跨膜运输主要是蛋白质在线粒体的运输方式，由于线粒体是双层膜结构，蛋白质借导肽进入线粒体后必然需要第二、第三甚至多个信号将其分配至线粒体内膜、膜间隙及膜内隙等非外膜的区域。TOM/TIM 复合物分别是线粒体外膜和内膜上的受体，是线粒体蛋白质转运研究的热点分子。膜泡运输是细胞内蛋白质转运的最主要形式，在内质网合成的蛋白质都是采取此方式进行转运的。由于蛋白质被包裹在囊泡内，其信号序列必须体现在膜泡的外部特征上，才能使信号得以识别。被转运的蛋白质通过与受体结合，再与衔接蛋白（adaptin）结合，衔接蛋白介于笼形蛋白与配体受体复合物之间，起连接作用。衔接蛋白与受体的结合可能不是一对一的，一种衔接蛋白能与几种受体结合，并且再募集衣被蛋白形成 Clathrin、COPⅠ、COPⅡ的衣被小泡。这种小泡使膜泡具有了一定的外部特征，能够进行定向运输，其中 Clathrin 衣被小

泡的运输方向为质膜→内体、高尔基体→内体、高尔基体→溶酶体，而 COPⅠ、COPⅡ的衣被小泡的运输方向分别为高尔基体→内质网、内质网→高尔基体。但是由于衣被在膜泡到达靶细胞器前就脱落了，所以还需要 Rab 和 SNARE 分子进行膜泡与靶膜的融合。SNARE 分子是目前研究的热点，关于该分子的研究常常使用结构生物学的方法。该分子是一个大家族，不少于 60 个成员，SNARE 分子含有疏水的螺旋状结构能够互相结合形成复合物。膜泡上的 V-SNARE 能够和靶细胞器上的 t-SNARE 螺旋状结构域相互缠绕形成复合体，起着类似绞车的作用，释放出的能量使两膜的脂双层靠近，并把水分子挤出界面，相互结合，从而介导膜的融合。这种结合过程中最重要的调节环节是依赖于脂质修饰的胞质/膜循环。

囊泡运输过程不是采取布朗运动的方式，而是一种耗能的运输过程。这一点对于神经细胞尤为重要，因为有的神经细胞轴突可长达 1m，由于整个轴突没有核糖体，不能进行蛋白质的合成，神经递质在细胞核周围的内质网合成后，需要运送到神经末梢进行神经活动，假如这种运送过程是以布朗运动也就是自由扩散实现，可能需要几年的时间。马达蛋白是介导囊泡转运的动力装置。假如我们把囊泡包裹的蛋白质当作货物分子，马达蛋白就类似于运输货物分子的货车。马达蛋白的分子结构包括两个部位即结合囊泡的尾部，类似于货仓和具有运动能力的头部。头部置于微管上，有两个球状结构，具有 ATP 水解酶的功能，能够与 ATP 结合，通过水解 ATP 产生的能量转化为机械动能，带动货物也就是囊泡运输。马达蛋白有 20 多种，主要的类型为驱动蛋白（kinesin）、动力蛋白（dynein）和肌球蛋白（myosin）。其中动力蛋白和驱动蛋白沿微管运输，而肌球蛋白沿微丝运输，可以说微管和微丝就好像是高速公路一样。动力蛋白运输货物的方向是趋向微管负端，即向细胞核方向运输。驱动蛋白趋向微管正端，即向细胞膜方向运输。肌球蛋白Ⅴa 趋向微丝的正端，向细胞膜方向；肌球蛋白Ⅵ趋向微丝的负端，向细胞核方向。

马达蛋白的运动方式是该领域的研究热点和难点，由于马达分子极小，它的运动距离只有纳米级，想要了解它的运动方式是很困难的。对于马达蛋白的运动常采用光镊技术和单分子荧光标记（FIONA）等技术，这在一般实验室是难以完成的。利用这种技术，基本上明确了驱动蛋白的步态是一种“hand over hand”，即交替运动的方式。而之前的观点则认为驱动蛋白的运动方式类似于尺蠖（inchworm），即亦步亦趋的运动。

马达蛋白的异常会引起如阿尔茨海默病、运动神经元坏死、截瘫等很多神经性疾病。因此研究马达蛋白将有助于理解和解决神经系统的疾病，具有重要的生物学意义。但是，由于研究的难度相当大，我们知道微管和微丝在细胞内是纵横交错的，马达蛋白在微丝、微管的复杂管道中会不会“堵车”？怎么进行有序调

控？不同的马达蛋白会不会互相抢夺“货物”？这涉及囊泡运输在复杂网络中的调控问题，也是细胞生物学研究的难点和热点问题。

综上所述，尽管人们对大分子在细胞内的转运有了一些初步的理解，比较宏观的认识架构也已经建立。但是具体的细节还不甚清楚，对于这一问题的研究主要涉及分子水平和亚细胞水平。可以清楚地展望到的是不同的结构生物学手段将在分子水平即蛋白质信号与受体的结合方式、如何启动序贯的构象改变从而传递蛋白质的不同信号等方面发挥重要的作用。但是在亚细胞水平的工作更为棘手，首先要解决的是研究工具的问题，需要有能在活细胞状态下实时观测亚细胞即细胞器以及大分子团的运动、相互作用的精密仪器，这样才有可能解决细胞内复杂环境中大分子的有序转运问题。

参考文献

Chacinska A, van der Laan M, Mehnert CS, et al. 2010. Distinct forms of mitochondrial TOM-TIM supercomplexes define signal-dependent states of preprotein sorting. Mol Cell Biol, 30(1): 307～318

Gontan C, Güttler T, Engelen E, et al. 2009. Exportin 4 mediates a novel nuclear import pathway for Sox family transcription factors. J Cell Biol, 185(1): 27～34

Lonhienne TG, Forwood JK, Marfori M, et al. 2009. Importin-beta is a GDP-to-GTP exchange factor of Ran: implications for the mechanism of nuclear import. J Biol Chem, 284(34): 22549～22558

Ross JL, Ali MY, Warshaw DM. 2008. Cargo transport: molecular motors navigate a complex cytoskeleton. Curr Opin Cell Biol, 20(1): 41～47

Wen W, Yu J, Pan L, et al. 2010. Lipid-Induced conformational switch controls fusion activity of longin domain SNARE Ykt6. Mol Cell, 37(3): 383～395

Yildiz A, Selvin PR. 2005. Kinesin: walking, crawling or sliding along? Trends Cell Biol, 15(2): 112～120

撰稿人：李　郁
第四军医大学

细胞内两条蛋白质降解途径间存在交互调节吗

Is There Any Cross-Talk Between Two Pathways of Intracellular Protein Degradation

蛋白质是细胞生命活动功能的体现者。蛋白质不仅是细胞最基本的构成物质之一，而且参与各种生命活动的调节，其存在形式的多样性，如酶、激素、免疫物质、载体、超分子结构等，印证了生命活动的复杂性（图 1）。蛋白质处于不断的代谢过程之中，由此，可把蛋白质分成长寿命蛋白和短寿命蛋白两大类。但是 100 多年来，研究者关注的焦点一直是蛋白质合成的研究，而蛋白质降解的研究长期处于被忽视的状态。这可以从与蛋白质合成有关的研究成果已有五项获得了诺贝尔奖，而 2004 年之前与蛋白质降解有关的研究只有 Duve 关于溶酶体的发现获得过诺贝尔奖得到证实。但 20 世纪 70 年代中期以来，这种状态已经改变，原来不受重视的蛋白质降解研究领域变成生命科学的研究热点之一，这归功于 2004 年因泛素介导的蛋白酶体途径的发现获得了诺贝尔奖的三位科学家。可以说，关于蛋白质降解的研究，为生命科学某个研究领域从“冷门”向“热点”转变提供了一个生动的范例。

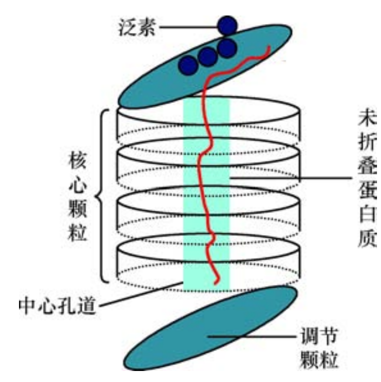


图 1　26S 蛋白酶体结构示意图

如此一来，细胞中存在两条蛋白质降解途径的轮廓就日渐明晰起来（图 2 和图 3）。经过生物学家的不懈努力，已经明确了在人类基因组中，与蛋白质合成相关的基因约占 1%，而与蛋白质降解有关的基因超过了 3%。蛋白质在行使功能后，需要在特定的时空条件下进入降解过程。研究发现，细胞内蛋白质降解

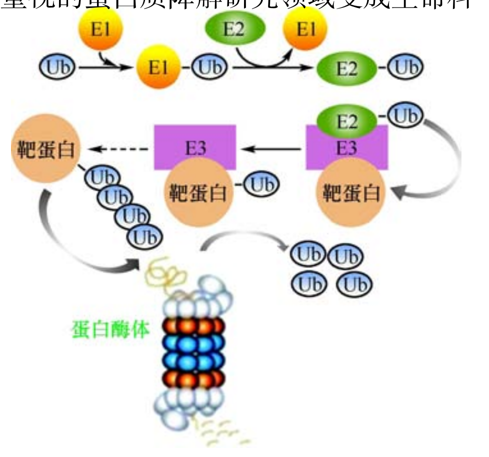


图 2　降解胞内蛋白质的泛素-蛋白酶体系统

Ub. 泛素；E1. 泛素激活酶；E2. 泛素结合酶；E3. 泛素连接酶

主要通过溶酶体途径（自噬）和泛素介导的蛋白酶体系统（ubiquitin-proteasome system，UPS）得以实现。前一途径不消耗能量，主要降解细胞外和细胞膜等长寿命蛋白质；后一途径则需要消耗能量，主要以降解短寿命蛋白质为主。从被降解的蛋白质总量上分析，后一条途径在细胞内蛋白质降解中发挥主导作用。有数据表明，细胞内新合成的蛋白质 30% 被降解，而其中的 90% 通过泛素介导的蛋白酶体途径完成。

但是，在细胞内蛋白质降解过程中，两条降解途径之间是否存在交互调节现象？即两条降解途径之间是否具有相互补偿或抑制作用，从而有效维持细胞内环境的稳定（homeostasis）？阐明这一问题不仅具有重要的理论意义，而且在治疗肿瘤、神经退行性疾病等临床疾病中也具有不容忽视的价值。一般认为，蛋白酶体降解途径与泛素化修饰紧密联系，被降解的蛋白质首先要通过三种与泛素化修饰有关的酶（即泛素激活酶 E1、泛素结合酶 E2 和泛素连接酶 E3）的作用，首先使将被降解的蛋白质发生多泛素化。但 Rubinsztein 等（2009）的研究表明，底物的泛素化不仅与泛素介导的蛋白酶体降解途径有关，同时也与溶酶体途径（自噬）有关。泛素化也可作为选择性自噬的信号。换句话说，泛素化在两条降解途径之间起到了一种协调作用。有证据表明，有些泛素化的蛋白酶体底物，在某些条件下，也可以通过自噬得以降解，反之亦然。McConkey 等（2009）研究发现，蛋白酶体抑制剂和 siRNA 调节的蛋白酶体亚单位抑制可以促进自噬体（autophagosome）的形成，在人前列腺癌细胞和永生化的胚胎成纤维细胞中，可以上调自噬特异性基因（autophagy-specific gene，ATG）（ATG5 和 ATG7）的表达。这种上调只存在于表达蛋白酶体抑制剂诱导的真核转录起始因子 2α（eukaryotic translation initiation factor 2 alpha，eIf-2α）磷酸化的细胞中。同时抑制自噬和蛋白酶体可以诱导胞内蛋白质聚集。

过去一直认为，UPS 和自噬-溶酶体途径是相互独立和平行而无交叉的两种蛋白质降解方式，现在这一观点已经受到了新的研究结果的挑战。Zheng 等（2009）通过研究蛋白病（如阿尔茨海默病、帕金森病及肌萎缩性脊髓侧索硬化症等）发现，UPS 与自噬的协同对于细胞内蛋白质质量控制似乎是必不可少的。在蛋白病中，UPS 的水解功能常常不足，并因此导致自噬的激活，借此移除异常蛋白质尤其是聚集形式的蛋白质。组蛋白去乙酰化酶 6（histone deacetylase 6，HADC6）、p62（一种接头分子）和 FoxO3（一种转录因子）在组织蛋白质水解“联合体”中可能发挥了重要作用。HADC6 与聚集体（aggresome）的形成有关，而聚集体则被自噬所清除。p62 是将泛素化蛋白与自噬联系在一起的接头分子，通过 C 端的泛素结合（ubiquitin associated，UBA）结构域与多泛素化的底物结合，而 N 端的泛素样结构域（ubiquitin-like Domain，ULD）与蛋白酶体相互作用。p62 通过促进自噬降解泛素化蛋白质在 UPS 与自噬之间发挥关键联

系作用，p62 自身则既可由 UPS 所降解，也可通过自噬被降解。西罗莫司可使内源性 p62 减少。FoxO3 对两种降解途径的激活作用，可能在于诱导与两个降解途径有关的调节基因的转录，而不是调节两个系统之间的直接交互作用。就蛋白病治疗而言，通过增强自噬的方式比较可行，而通过增强 UPS 的策略则较为困难，认为可能是由于增强 UPS 的功能可以加速细胞内关键性的短寿命调节分子的降解，继而对细胞产生不利影响。

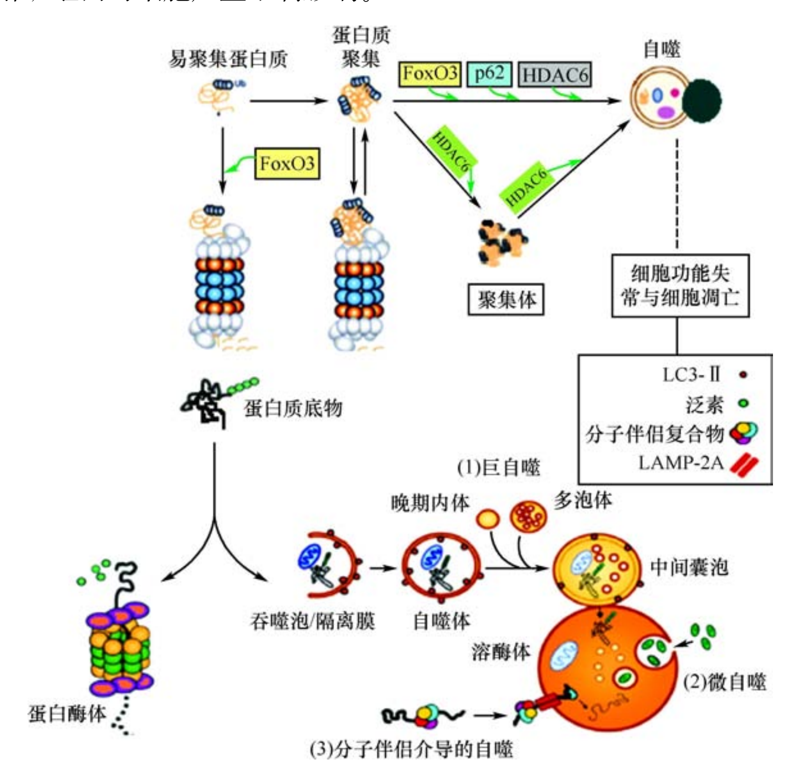


图 3　泛素化蛋白质底物通过两条降解途径被降解

目前认为，两种降解途径是功能相关的分解代谢过程，它们分享共同的底物和调节分子，而且在一定范围内表现出协调性和功能补偿性。换句话说，通常认为通过 UPS 降解的短寿命蛋白质底物，在某些情况下，也可以经自噬被选择性降解，而长寿命蛋白质底物同样可以由 UPS 降解。例如，α-synuclein（突触核蛋白）就可以通过 UPS、巨自噬和分子伴侣介导的自噬三种方式所降解。此外，蛋白酶体也可被自噬所降解。但是目前关于抑制自噬对泛素-蛋白酶体途径的影响尚不清楚，特别是 K48 和 K63 位点连接的多泛素链是否分别与泛素-蛋白酶体途径和自噬途径相关也需要进一步明确，两种降解途径对降解底物的选择机制仍有待更为深入的研究。上述问题的解决将为诸如肿瘤和神经退行性等疾病的治疗带来新的希望 。

参考文献

Adams J. 2003. The proteasome: structure, function, and role in the cell. Cancer Treat Rev, 29 (Suppl 1): 3~9

Cuervo AM, Palmer A, Rivett AJ, et al. 1995. Degradation of proteasomes by lysosomes in rat liver. Eur J Biochem, 227 (3): 792~800

Kirkin V, McEwan DG, Novak I, et al. 2009. A role for ubiquitin in selective autophagy. Mol Cell, 34 (3): 259~269

Korolchuk VI, Menzies FM, Rubinsztein DC. 2009. A novel link between autophagy and the ubiquitin-proteasome system. Autophagy, 5 (6): 862~863

Korolchuk VI, Menzies FM, Rubinsztein DC. 2010. Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. FEBS Lett, 584(7): 1393~1398

Lamark T, Johansen T. 2010. Autophagy: links with the proteasome. Curr Opin Cell Biol, 22 (2): 192~198

Nedelsky NB, Todd PK, Taylor JP. 2008. Autophagy and the ubiquitin-proteasome system: collaborators in neuroprotection. Biochim Biophys Acta, 1782(12): 691~699

Pandey UB, Nie Z, Batlevi Y, et al. 2007. HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. Nature, 447 (7146): 859~863

Zheng Q, Li J, Wang X. 2009. Interplay between the ubiquitin-proteasome system and autophagy in proteinopathies. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol, 1(2): 127~142

Zhu K, Dunner K Jr, McConkey DJ. 2010. Proteasome inhibitors activate autophagy as a cytoprotective response in human prostate cancer cells. Oncogene, 29(3): 451~462

撰稿人：刘宏颀
第四军医大学

原核细胞骨架蛋白类似物带给我们哪些启示

What Does It Mean for Us That Cytoskeleton Homologous Proteins Exist in Prokaryotes

细胞骨架的出现是细胞进化过程中的关键事件之一。过去普遍认为细胞骨架是真核细胞所特有的结构，原核细胞不存在细胞骨架。因此，以往在探索细胞进化的过程中，更多的关注点放在核酸和膜系统上，即使从蛋白质角度讨论进化，也一直忽略了细胞骨架的作用和价值。关于生物和细胞进化最具代表性的研究成果有两项：其一是 20 世纪 70 年代末，美国伊利诺斯大学的 Woese 等（1990）对大量微生物和其他生物进行 16S 和 18S rRNA 的寡核苷酸测序，在比较了其同源性水平后，提出了一个与以往各种界级分类不同的新系统，称为三域学说，即细菌域（Bacteria）、古菌域（Archaea）和真核域（Eukarya）。其二是由美国生物学家 Margulis 于 1970 年出版的《真核细胞的起源》一书中，提出了关于真核细胞起源的“内共生假说”，并且获得了新的支持证据，“内共生假说”进一步发展为“代谢共生假说”。原核细胞中真核细胞骨架同源类似物的发现，就是其中有代表性的成果之一。

生物学界普遍认为，细胞的进化经历了从原核细胞到真核细胞的过程。真核细胞在进化的过程中，显然需要更加完善的细胞骨架体系。但由于一直缺乏原核细胞与真核细胞在细胞骨架方面存在联系的线索和证据，故细胞生物学研究者希望通过细胞骨架追溯细胞进化历程始终是一个具有探索价值的领域。

直到 20 世纪 80 年代后，多项研究成果使这一领域获得了快速发展。Lutkenhaus 等（1980）发现大肠杆菌突变株中具有一种丝状热敏感性基因 Z（filamentous temperature sensitive gene Z，FtsZ）。随后三个研究组先后独立地发现了细菌 FtsZ 蛋白是微管蛋白的同源类似物，随后的研究进一步证实 FtsZ 可在体外装配成丝状结构。Erickson 等（1992）确认 FtsZ 组装的结构与微管相类似。Lowe（1998）进一步研究发现，FtsZ 的三级结构与微管蛋白极为相似，并明确了 FtsZ 为微管蛋白的原核类似蛋白。进而 Bork 等（1992）通过序列分析发现细菌具有与肌动蛋白相关的基因，随后他们还进一步发现细菌有三种蛋白质与肌动蛋白相关，即 FtsA、MreB 和 ParM。但其后有 8 年的时间没有继续进行跟踪研究。直到 2000 年，Van den Ent 和 Löwe 才对 FtsA 进行了晶体结构分析。2001 年，Jones 等在枯草芽孢杆菌中证实有螺旋状细丝的存在，Van den Ent 等证实

MreB 可以组装成肌动蛋白样的丝状结构，他们的研究为 MreB 是肌动蛋白同源类似物提供了明确证据。Ausmees 等（2003）报道在新月柄杆菌中克隆到一个与形态建成有关的基因——CreS，表达的蛋白质为 CreS（crescentin），其在氨基酸序列、二级结构和生化特性等方面都与中间纤维高度相似，在不需要提供能量和辅助因子的条件下，可在体外组装成纤维丝状结构。至此，与真核细胞骨架成分相似的骨架蛋白同源类似物均已在原核细胞中发现，同时还先后发现了许多其他的原核细胞骨架蛋白类型。

从“三域学说”和“内共生假说”推理，在古细菌、线粒体与质体中也应当存在细胞骨架蛋白。随着在线粒体、叶绿体和古细菌中也相继发现存在原核细胞骨架蛋白 FtsZ，在古细菌中发现了肌动蛋白同系物 Ta0583，一个关于细胞骨架起源与进化的轮廓图已经日渐明晰起来。可以说，通过对原核细胞骨架蛋白的研究，在一定程度上进一步证实了 Woese 提出的“三域学说”和 Margulis 提出的“内共生假说”。此外，研究表明，在贾第虫这种较低级的真核生物中，也具有与其他真核生物相似的高度发达的、复杂的细胞骨架系统。

细胞骨架显然经历了从原核细胞到真核细胞的进化过程，在进化的过程中，骨架蛋白不仅体现出一定的保守性，而且随着真核细胞功能的演进赋予了细胞骨架更多的功能。原核细胞与真核细胞细胞骨架蛋白在分子结构与细胞功能上的相似性，值得从分子进化方面做更深入的探索，继续追踪细胞骨架进化，也为研究细胞进化提供了一个新的方向。

原核细胞骨架的研究，为探索真核细胞的起源提供了新的证据，也使关于细胞骨架起源与进化的难题重新进入了人们的视线，并且正成为弥补原核细胞与真核细胞进化缺失环节的重要研究内容。同时，原核细胞骨架的研究，也为探索新的原核生物所致的感染性疾病的发病机制及形成新的治疗策略提供了十分有价值的理论依据。

在后基因组时代的今天，在蛋白质组学研究中，原核细胞的真核细胞骨架同源蛋白或同源类似物是值得高度重视的一类蛋白。鉴于原核细胞骨架在细胞形态、细胞分裂等方面起着主导性控制作用，对此类蛋白及其相关蛋白的深入研究，不仅在细胞进化研究中具有举足轻重的作用，同时对预防和控制细菌感染性疾病的发生也将发挥不可替代的作用。在已有的基础上，从分子结构与功能、装配及其动态、相关蛋白、基因结构、原核细胞与真核细胞骨架蛋白相互作用等方面对原核生物、古细菌、原生生物、线粒体和质体进行系统的骨架蛋白比较研究，将无疑会为全面揭示细胞骨架的起源与进化路径提供新的线索和信息。

参 考 文 献

Ausmees N, Kuhn JR, Jacobs-Wagner C. 2003. The bacterial cytoskeleton: an intermediate fila-

ment-like function in cell shape. Cell,115 (6): 705～713

Baumann P, Jackson SP. 1996. An archaebacterial homologue of the essential eubacterial cell division protein FtsZ. Proc Nat Acad Sci,93 (13): 6726～6730

Jones LJ, Carballido-Lopez R, Errington J. 2001. Control of cell shape in bacteria: helical,actin-like filaments in Bacillus subtilis. Cell,104 (6): 913～922

Löwe J. 1998. Crystal structure determination of FtsZ from *Methanococcus jannaschii*. J Struct Biol,124(2-3): 235～243

Miyagishima S-Y, Nishida K, Kuroiwa T. 2003. An evolutionary puzzle: chloroplast and mitochondrial division rings. Trends Plant Sci,8 (9): 432～438

Narahara A, Naterstad K, Kristensen T,et al. 1992. Cloning of a gene from *Bacillus cereus* with homology to the mreB gene from *Escherichia coli*. Gene,122 (1): 181～185

Roeben A, Kofler C, Nagy I,et al. 2006. Crystal structure of an archaeal actin homolog. J Mol Biol,358 (1): 145～156

van den Ent F, Amos LA, Löwe J. 2001. Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. Nature, 413 (6851): 39～44

van den Ent F, Löwe J. 2000. Crystal structure of the cell division protein FtsA from thermotoga maritima. EMBO J,19 (20): 5300～5307

Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains archaea, bacteria, and eucarya. Proc Natl Acad Sci,87(12): 4576～4579

撰稿人：刘宏颀

第四军医大学

细胞如何选择死亡方式

How Does Cell Die

细胞死亡对保持机体内环境的平衡、维持正常的生理活动起着重要的作用。如果细胞死亡受到抑制，则可能促进细胞癌变或引起自身免疫性疾病。而当神经细胞大量死亡的时候，则可能引起老年性痴呆等神经系统退行性疾病的发生。目前，有关细胞死亡的研究已经渗透到了生命科学研究的各个领域，成为生命科学的研究热点问题。

细胞死亡是精密调控的复杂过程，凋亡是最早确定的细胞程序性死亡方式，它已被广泛研究并确认其在许多病理过程中发挥重要作用。近年来发现细胞还存在另一种程序性死亡方式——自噬，它在生物体发育、衰老和死亡过程中起了非常重要的作用。《Science》杂志将自噬与细胞死亡的相关研究列为 2005 年科技领域的六大热点之一。

细胞采取何种死亡途径取决于其受到的刺激因子和环境因素，然而凋亡和自噬并非各自独立，而是在多个层面相互影响。因此，在临床研究中，如果只孤立地考虑某一种死亡程序的作用，则无法正确预测抑制或活化某种死亡程序所能导致的结果。而自噬本身对细胞存活和死亡具有双重调节作用，更使其与凋亡之间的联系变得复杂。因此，自噬和凋亡途径如何相互影响调控细胞死亡是当前一个深刻和亟待解决的问题。

当细胞发生凋亡时，如果凋亡通路中的重要基因被抑制，则能观察到细胞的死亡率明显下降。细胞凋亡的定义基于死亡细胞发生的一系列特定形态学的变化，其中最为显著的特征是细胞核发生的变化。另外，凋亡过程很多时候会出现半胱天冬酶（caspase）的激活，caspase 在细胞凋亡过程中发挥重要作用。然而，在研究中还存在一些尚不明确的问题。例如，用凋亡相关的生化分析（如 DNA ladder 凋亡检测、Annexin Ⅴ-PI 检测）并不能肯定细胞发生凋亡，因为凋亡有时并不产生 DNA 寡核酸碎片，而半胱天冬酶的激活也并不能肯定细胞发生凋亡。

自噬在细胞死亡中的作用非常复杂。最近的研究表明，自噬可能促进细胞死亡，也可能抑制细胞死亡，也可能与细胞死亡没有直接关系。自噬可以促使细胞发生 caspase 依赖的死亡，一般表现为凋亡；其也可使细胞发生不依赖的 caspase 死亡，其机制并不清楚。关于自噬是否是直接造成细胞死亡的原因，尚存在争

议。抑制自噬有可能选择性地抑制了细胞死亡的某些特征，而并不能抑制细胞死亡。自噬发生的不同阶段，可能对细胞死亡的作用并不一样。目前，还没有发现特异性的自噬通路抑制剂，这也为研究带来了一定的困难。

目前，对于细胞发生凋亡或自噬的机制已经有了不同程度的认识，具体机制还有待进一步阐明。随着研究的深入，已发现两者之间存在着非常复杂的交互作用。目前认为，凋亡与自噬存在着三种关系（图 1）。

(1) 凋亡与自噬协同促进细胞死亡（图 1A）：凋亡和自噬可能同时发生，共同导致细胞死亡。在某些情况下，如果一种细胞死亡程序被阻断（如通过特异性药物抑制），另一种死亡程序则会增强，细胞像是采用了“双保险”以确保细胞死亡。例如，T 淋巴细胞瘤白血病细胞用三氧化二砷处理后，同时激活了凋亡和自噬。并且，当用自噬抑制剂 3-MA 抑制自噬时，发生类似坏死的细胞比例减少了，而发生凋亡的细胞比例显著增多。这表明凋亡和自噬都促进了细胞死亡，从而减缓肿瘤生长。

(2) 凋亡和自噬相互拮抗（图 1B）：在这种情况下，凋亡和自噬是不同的过程，其目的也不一样。自噬并不导致细胞死亡，而是通过营造一个促进细胞存活的环境，从而抑制凋亡。例如，线粒体选择性自噬（mitophagy）能够直接阻止线粒体膜通透性发生改变，抑制促凋亡因子如细胞色素 C、Smac/Diablo 从线粒体释放，从而抑制凋亡。反过来，抑制自噬能够促进细胞在 DNA 损伤、内质网应激等条件下发生凋亡。例如，在乳腺癌、前列腺癌、皮肤癌及恶性神经胶质瘤细胞里抑制自噬，能够提高这些细胞对放射治疗的敏感性，促进肿瘤细胞死亡。

(3) 自噬在细胞凋亡的过程中促进细胞凋亡的相关特征发生（图 1C）：在这种情况下，自噬并不直接促进死亡，但参与到细胞凋亡通路里，促进细胞凋亡，但并不是促进凋亡的上游调控通路。例如，当营养缺失的时候，需要依赖自噬来维持细胞内的 ATP，这个过程也会促进磷脂酰丝氨酸 PS 外翻，这是吞噬细胞所能识别的“被吞噬”信号，因此介导细胞被吞噬和凋亡小体的清除。同样，凋亡细胞表面出现小泡（membrane blebbing）也是一个能量依赖的过程，需要 ATP 驱动肌动球蛋白收缩，自噬也可能参与了这个过程。已有研究表明，在体内自噬产生的 ATP 对凋亡细胞的清除也是必需的。

凋亡和自噬之间的交互作用，其本质是细胞内调控这两个死亡通路的分子存在着内在关联，大量的死亡刺激因子能够活化死亡通路上的效应分子，从而激活或抑制特定的死亡程序。然而，这两种死亡通路又共享着一些对于执行凋亡或自噬非常关键的调控元件，包括重要的调节基因（p53、p19ARF、DAPk）及与细胞死亡密切相关的蛋白质（如 Atg5、Bcl-2 家族蛋白）。这使得凋亡和自噬之间的交互作用变得非常复杂，有时还相互对立，但却对细胞的整体命运至关重要。

此外，这种交互作用也是癌症等死亡相关疾病病理过程的关键因素。然而已

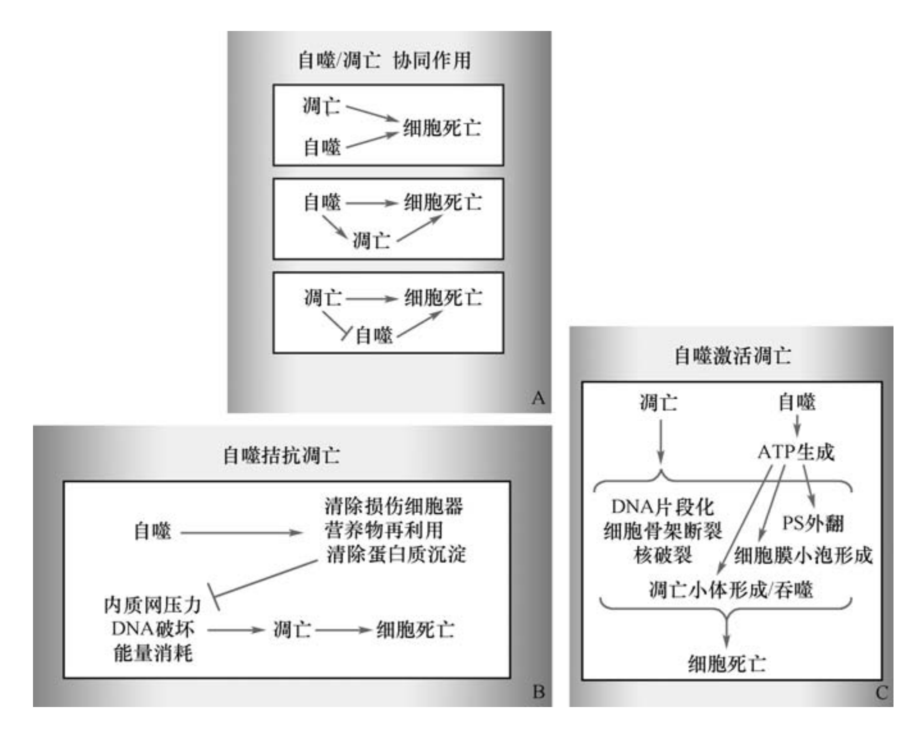


图 1 凋亡与自噬交互作用示意

修改自 Eisenberg-Lerner A. 2009

有的临床研究表明，通过抑制自噬通路上的某个分子而抑制细胞自噬时，既观察到了对肿瘤生长的抑制，也观察到了对肿瘤生长的促进。因此，死亡通路上关键分子其尚未明晰的调控机制，为针对其作为靶点的疾病治疗带来了不确定性。由此可见，细胞程序性死亡机制的研究，不仅是确定调控细胞凋亡和自噬的信号分子，更为重要的是明晰这些信号分子在凋亡和自噬之间的交互作用，这是亟须深入研究和探讨的科学问题。这一问题的研究，将加深人们对细胞死亡机制的认识，并对发展新的疾病治疗策略、评估现有治疗手段和药物及个体化医疗产生至关重要的影响和作用。

参 考 文 献

Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon H-U, et al. 2009. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. Cell Death Differ, 16(7): 966～975

Galluzzi L, Joza N, Tasdemir E, et al. 2008. No death without life: vital functions of apoptotic effectors. Cell Death Differ, 15(7): 1113～1123

Ito H, Daido S, Kanzawa T, et al. 2005. Radiation-induced autophagy is associated with LC3 and its inhibition sensitizes malignant glioma cells. Int J Oncol, 26(5): 1401～1410

Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ. 2007. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. Arch Biochem Biophys, 462(2): 245～253

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, et al. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. Cell Death Differ, 16(1): 3～11

Pop C, Salvesen GS. 2009. Human caspases: activation, specificity, and regulation. J Biol Chem, 284(33): 21777～21781

Qian W, Liu J, Jin J, et al. 2007. Arsenic trioxide induces not only apoptosis but also autophagic cell death in leukemia cell lines via up-regulation of Beclin-1. Leuk Res, 31(3): 329～339

Qu X, Zou Z, Sun Q, et al. 2007. Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. Cell, 128(5): 931～946

撰稿人：宋　斐

第四军医大学

流动强化细胞黏附的逆锁键机制

Catch-Bond Mechanism of Flow-Enhanced Cell Adhesion

细胞需要特异性地黏附其所在环境中的细胞和胞外的组分以行使各种生理功能，这种识别多种环境暗示并经历特异性黏附的能力对组织发育和维持、粒细胞介导的炎性反应、淋巴细胞归巢及肿瘤细胞转移等各种复杂的分子功能非常重要。细胞黏附是由表达在细胞表面的黏附受体和配体之间的特异性相互作用介导的。这些锚定在细胞表面的受体必须抵抗机械力以阻止由外部的液流、组织或底物的压力及内部细胞骨架的拉力所造成的从细胞上的脱离。在生物学中，功能包含了力学作用的分子很可能受到力学因素的调节，那些产生、施加或传导力的分子也很可能受力的调节，细胞黏附分子就是其中最典型的例子。因此，外力如何调节分子相互作用是生物学中的一个基本问题。

细胞黏附是由特异性的受体-配体键所介导的。在一些生物体系中，增加的流动被观察到强化了细胞的黏附，尽管它增加了推移流体剪切力。例如，白细胞需要一个阈值剪切以便在内皮细胞的炎症或损伤位置附着并滚动。流动强化的白细胞黏附包括了违反直觉的和符合直觉的两方面的现象：当壁剪切应力降至阈值以下时，更少的白细胞附着和滚动，那些还附着和滚动着的则滚动得更快速、更没有规律，也更容易脱离，这同样也减少了滚动着黏附的白细胞的数量。这是违反直觉的，因为壁剪切应力越高，液流施加在细胞上的推移力就越大。在达到一个最佳的水平后，壁剪切应力的进一步增加则导致附着率的降低，滚动着黏附的白细胞数量的减少及滚动速度的增加。这是符合直觉的。另一个例子是，血小板需要一个最低流量以便在内皮组织破裂后暴露的血管壁的胞外基质上附着和滚动。此外，一些肠源性杆菌需要一个最低流量以黏附至肠上皮细胞上。细胞黏附是由细胞表面的黏附受体和配体之间的特异性相互作用介导的。在上述例子中，白细胞黏附至血管内皮是由选择素（selectin）与 P-选择素糖蛋白配体 1（P-selectin glycoprotein ligand 1，PSGL-1）之间的相互作用介导的。血小板黏附至损坏的血管壁是由血小板糖蛋白 Ib（platelet glycoprotein Ib，GPIb）与血小板性血友病因子（von Willebrand factor，VWF）之间的相互作用介导的。细菌黏附至肠上皮细胞是由 FimH 受体与甘露糖化糖蛋白之间的相互作用介导的。这些分子相互作用与液流之间的互动是造成违反直觉的流动强化的细胞黏附的主要原因。受体-配体相互作用是由结合和解离状态之间快速转变的动力学控制的。因此，流动很有可能是通过改变这些动力学速率而发挥其作用的。

我们现在所知道的许多生物学黏附分子在外力下的行为是由两位理论物理学家预测的（图1）。1978年，乔治·贝尔（George Bell）假定：外力可以指数级地增加一个生物学黏附键的解离速率，即“滑移键”（slip bond）理论。1988年，马可·邓波（Micah Dembo）假定：力不是增加而实际上可能是减低解离速率，外力可以使一个解离的配体陷入陷阱，延长解离的时间，即“逆锁键”（catch bond）理论。在这一理论被提出15年后，Marshall等采用原子力显微镜（AFM）和流动腔（flow chamber）实验首次观察到P-选择素（P-selectin）与其对应的P-选择素糖蛋白配体-1（PSGL-1）在外力作用下存在逆锁键现象。这些被称为逆锁键的生物学黏附键的寿命可以被外力所增强是近年来最令人激动，也是非常违反直觉的生物学发现之一。逆锁键的存在，不仅说明了在特定力范围内特异性分子间形成的键寿命能够随力增加而增加，同时也提示当力增加超过临界力时，逆锁键也会进入“滑移体”（slip regime），力会缩短键的寿命，可能由于更大的力克服了有活性的键。逆锁键机制也解释了白细胞为什么能够在血流剪切作用下到达炎症部位，启动炎症级联反应，因为血流施加的阈值剪切力增加了滚动着黏附的白细胞的数量。随着研究的进一步深入和广泛，逆锁键的数量还在增长，在酶催化、肽通过纳米孔的转位、DNA解链、光诱导的化学键解离及疏松材料的热膨胀中都发现类似逆锁键的存在。理解逆锁键的特点将能够使我们洞察生物学系统在受到外力微扰时的反应。

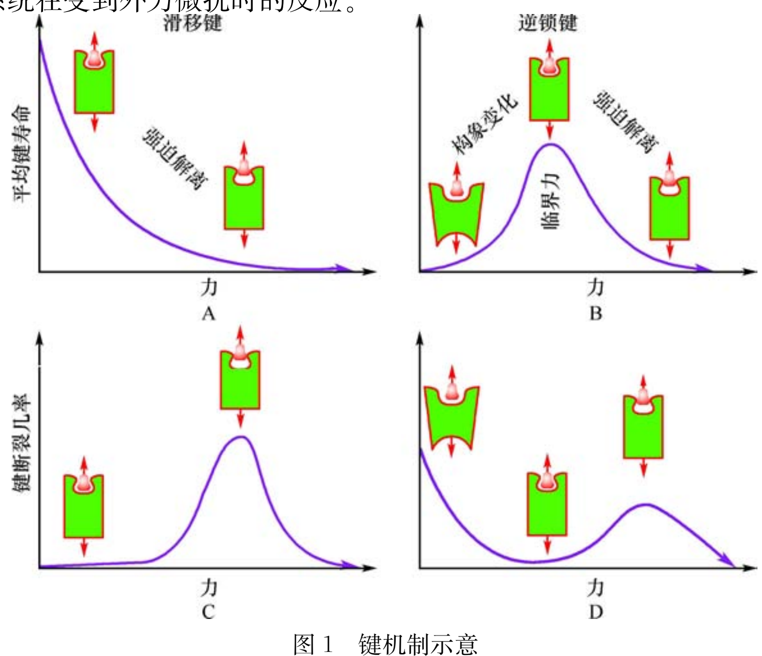
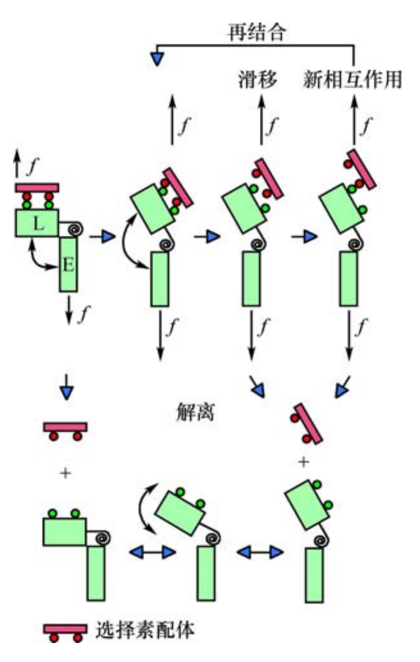


图1 键机制示意

A. 无外力激活，滑移键的寿命是力；B. 有外力激活，逆锁键的寿命是力的函数；C. 当力增加直至键断裂时滑移键的强度；D. 当力增加直至键断裂时逆锁键的强度

许多模型被提出来解释逆锁键现象，这其中主要有“变构模型”和“滑移-再结合模型”（图 2）。这两种模型都是受到 P-选择素结合配体和未结合配体的晶体结构差别的启发而提出的，因为未结合配体 P-选择素的结构显示结构域间的铰链区处于闭角（closed angle）或弯曲（bent）的构象，而结合了配体的结构则显示铰链区处于开角（open angle）或伸展（extended）的构象。尽管两种模型都支持结构域间区的调节对逆锁键很重要这一点，但不同的是：“变构模型”假设伸展的铰链角引起了结合口袋的构象变化，影响了解离速率；而“滑移-再结合模型”则假定力改变了结合口袋的方位而不是其构象。尽管还存在争论和一些尚未回答的问题，但这些研究结果是我们在解密违反直觉的逆锁键现象的结构起源方面迈出的重要的一步。



L. 凝集素结构域

E. 表皮生长因子结构域

图 2　选择素与配体相互作用的滑移-再结合模型

结构域间的铰链区用卷曲弹簧代表；配体结合到铰链角关闭的选择素上（左上方）；一个垂直于结合界面的低力（f，短箭头）支持配体的解离（左下方）；当外力增加时（f，长箭头），开角、闭角之间的构象平衡转变为支持张开的构象（右上方），这个倾斜的界面与力的方向一起使配体滑向界面的一边，滑移使得新的相互作用形成或原来的相互作用再形成（再结合）。最终，新旧相互作用都被打破，配体解离（右下方）

在过去的 10～15 年中，原子力显微镜（atomic force microscopy，AFM）、光镊（optical tweezers）和生物膜力探针（biomembrane force probes）等方法已被用来测定外力对单键的影响。近年来，AFM 成像和力光谱（force spectroscopy）技术更是取得了令人瞩目的进展。AFM 提供了在高分辨率和生理条件下可视细胞表面结构的手段，力波谱学则使得研究者可以测量生物分子间或分子内的相互作用。相信随着新技术成就的取得，AFM 成像的一个巨大挑战——活细胞单分子成像将在不久的将来成为可能。AFM 不仅可以在高分辨率下成像细胞表面，还可以探测赋予细胞结构-功能关系特性的基本的相互作用。目前，一些先进的 AFM 形式已经可用来探测相互作用的物理、化学和生物学本质，如化学力显微镜（chemical force microscopy，CFM）可以帮助我们理解细胞表面的独特性质是如何被化学地决定的。而单分子力显微镜（single-molecule force spectroscopy，SMFS）和单细胞力显微镜（single-cell force spectroscopy，SCFS）是鉴定细胞表面受体与其相应配体间特异性相互作用、绘制细胞

表面独特分子的分布及定量细胞-细胞和细胞-基质相互作用的两种非常有前景的方法。

参 考 文 献

Bell GI. 1978. Models for the specific adhesion of cells to cells. Science, 200(4342): 618～627

Dembo M, Torney DC, Saxman K, et al. 1988. The reactionlimited kinetics of membrane-to-surface adhesion and detachment. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 234(1274): 55～83

Marshall BT, Long M, Piper JW, et al. 2003. Direct observation of catch bonds involving celladhesion molecules. Nature, 423 (6936): 190～193

Müller DJ, Krieg M, Alsteens D, et al. 2009. New frontiers in atomic force microscopy: analyzing interactions from single-molecules to cells. Curr Opin Biotechnol, 20(1): 4～13

Prezhdo OV, Pereverzev YV. 2009. Theoretical aspects of the biological catch bond. Acc Chem Res, 42(6): 693～703

Thomas WE. 2009. Mechanochemistry of receptor-ligand bonds. Curr Opin Struct Biol, 19(1): 50～55

Thomas W. 2009. For catch bonds, it all hinges on the interdomain region. J Cell Biol, 174(7): 911～913

Zhu C, Yago T, Lou J, et al. 2008. Mechanisms for flow-enhanced cell adhesion. Ann Biomed Eng, 36(4): 604～621

撰稿人：余晓玲
第四军医大学

选择性剪接诱导的无义介导的 mRNA 降解真的没有意义吗

Alternative Splicing Induced Nonsense-Mediated mRNA Decay: Is It Really Nonsense

选择性剪接（alternative splicing，AS）是指从一个 mRNA 前体中通过不同的剪接方式产生不同的 mRNA 转录变异体（transcript variant）的过程，是真核蛋白多样性的最主要分子机制。mRNA 前体经加帽、剪接、加尾一系列的过程，成为成熟的 mRNA。分析人类基因发现，mRNA 前体中，平均 90% 的序列均被作为内含子切除，仅仅 10% 的外显子序列被拼接起来。人类细胞不但能够精确地识别这些外显子，还可以选择性地决定它们的取舍。人类基因的选择性剪接十分普遍，DNA 微阵列研究发现 74% 的人类基因存在选择性剪接，基于 EST 数据库的生物信息学分析显示 35% ～60% 的人类基因存在选择性剪接，选择性剪接已被认为是真核基因表达调控的普遍规则。

选择性剪接的主要功能就是改变蛋白质的结构及其功能。研究发现，大约 75% 的选择性剪接发生在 mRNA 的翻译区并影响了蛋白质的编码序列。蛋白质的序列改变会从多种机制上影响到蛋白质的结合功能、亚细胞定位、酶催化活性及蛋白质稳定性，其中最常见的机制包括引入或删除蛋白质功能结构域以及翻译后修饰位点。选择性剪接还可以影响 mRNA 的结构、翻译效率和稳定性，从而对基因表达实现了定量调控。其机制可能是通过改变 mRNA 的 5′-非翻译区（untranslational region，UTR）从而影响翻译元件的识别、结合和翻译起始，或改变 3′-UTR 从而通过 microRNA 介导的 RNA 干扰机制调节 mRNA 稳定性。

近年来人们注意到选择性剪接的另一结果就是将未成熟终止密码子（premature termination codon，PTC）引入 mRNA 中。在哺乳动物中，PTC 被定义为在外显子-外显子连接复合物（exon-exon junction complex，EJC）上游 50～55nt以外出现的终止密码子。各种选择性剪接模式均可能引入 PTC，如图 1 所示，盒式外显子、内含子保留、选择性 5′或 3′剪接位点均可引入 PTC；外显子跨越可能导致翻译移码而出现 PTC；此外，选择性启动子也可以引入 PTC。以前认为这样的转录本可能产生截短的蛋白异构体（protein isoform），但是现在发现在翻译过程中，PTC 会激活无义介导的 mRNA 降解机制（nonsense-mediated mRNA decay，NMD），从而导致 mRNA 降解。

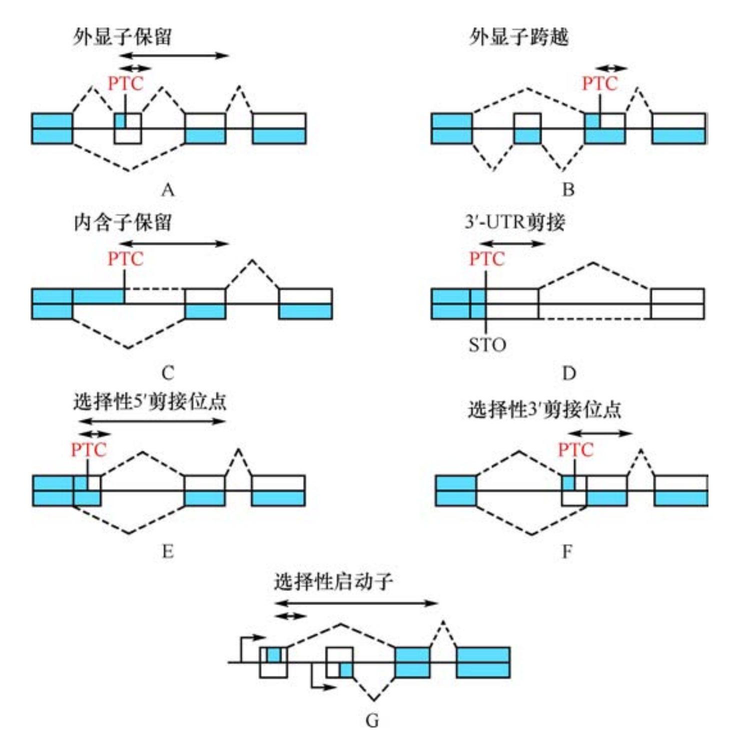


图 1　选择性剪接能以多种方式将 PTC 引入 mRNA

A、B. 盒式外显子（外显子保留和外显子跨越）导致读码框位移引入 PTC；C. 内含子保留引入 PTC；D. 3′-UTR 剪接改变可使正常终止密码子（STO）变成 PTC；E、F. 选择性的 5′或 3′剪接位点导致读码框位移引入 PTC；G. 选择性启动子转录产生不同的第一外显子和读码框，也可能引入 PTC。方框代表外显子，蓝色为开放读码框（ORF），白色为非翻译区（UTR），虚线代表剪接模式，双箭头代表外显子-外显子连接距离其上游 PTC 大于 50～55nt，单箭头代表启动子。PTC. 未成熟终止密码子；STO. 终止密码子

NMD 能够选择性降解含有 PTC 的 mRNA，从而防止对机体有害的截短蛋白的产生，它是真核生物中广泛存在的一种高度保守的有效的监督机制。除了清除突变基因和错误剪接的 mRNA 前体外，NMD 同时还识别人体细胞中自然发生的选择性剪接。如图 2 所示，mRNA 经过剪接成熟后，在每个外显子-外显子连接处仍保留有外显子连接复合物（EJC）。当终止密码子出现在外显子连接上游 50～55 nt 以内或者位于其下游时（正常终止密码子），核糖体在第一轮翻译中会彻底移除外显子连接复合体蛋白 mRNP，从而使翻译能反复进行。当外显子连接位点上游 50～55 nt 以外出现终止密码子（PTC）时，核糖体相关的 Upf 蛋白会与外显子连接复合体相互作用，激活 NMD 导致 mRNA 降解。NMD 降解 mRNA 有多种途径，包括在 PTC 位点附近进行核酸内切、从 5′末端进行脱帽及 5′→3′核酸外切、从 3′末端进行脱腺苷化及 3′→5′核酸外切。NMD 在真核基因

调控中十分普遍，例如 BRCA1 突变发生率很高，突变位点散在其 22 个编码外显子上，大部分突变都引入了 PTC。检测 30 种截短突变体发现，80% 的 PTC 激活了 NMD 机制，使其转录本含量下降至 1/5～2/3。NMD 发生的前提是翻译，只有在翻译起始后，PTC 被核糖体识别才能引发 NMD。如果没有起始翻译，那么即使 PTC 存在也不能激活 NMD。应用放线菌酮等蛋白质合成抑制剂阻断蛋白质翻译起始，就可以使 NMD 无法激活，从而使含有 PTC 的 mRNA 含量上调，这已成为 NMD 研究的基本方法。

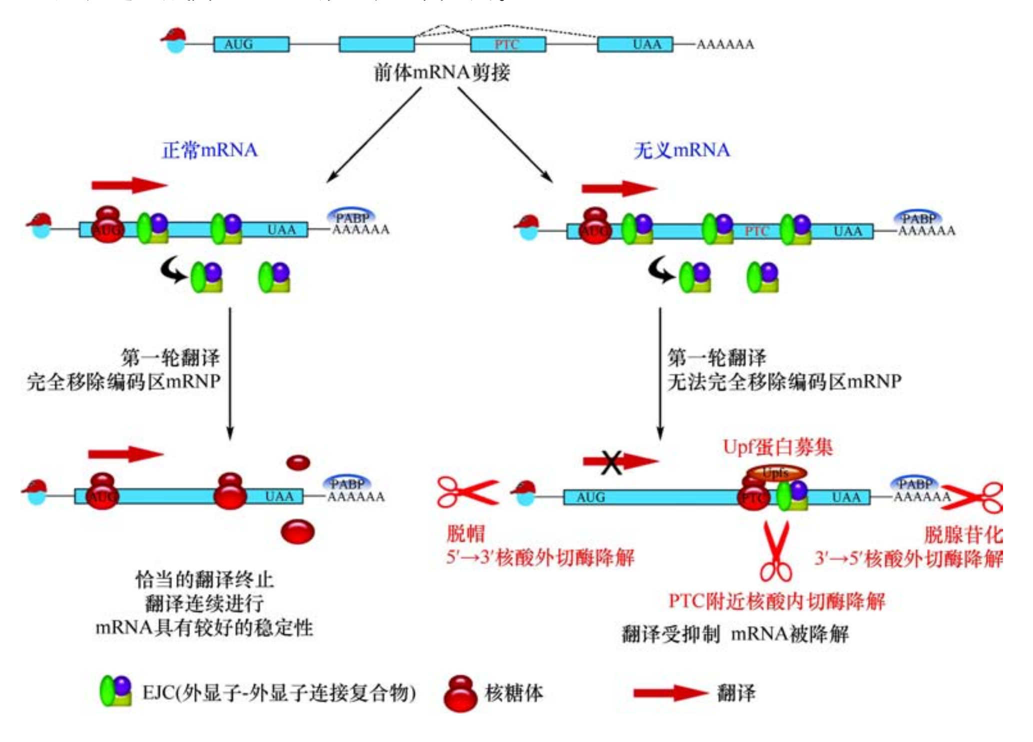


图 2 PTC 激活 NMD 的分子机制

左侧为正常 mRNA 的翻译过程，在第一轮翻译后，核糖体将所有编码区域的 EJC 等 mRNP 完全去除，从而使翻译能够连续进行；右侧 mRNA 由于外显子保含而引入 PTC 成为无义 mRNA，在翻译过程中核糖体识别与下游 EJC 距离大于 50～55nt 的 PTC，从而激活 Upf 蛋白介导的 NMD 机制，mRNA 被多种途径降解

目前发现，近 1/3 预测的选择性剪接体含有 PTC 并可能激活 NMD 降解机制。这提示选择性剪接和 NMD 是相互偶联的，这一过程被称为选择性剪接诱导的无义介导的 mRNA 降解（AS-NMD）。AS-NMD 产生大量的含有 PTC 的无义转录本并被降解，这一过程究竟有什么生物学意义呢？人们一直认为它们仅仅是错误的剪接产物，并没有什么其他的意义，AS-NMD 可能是一种监视机制。但

是通过研究大量的 AS-NMD 事件后，人们发现选择性剪接产生无义转录本的过程是受到调节的。细胞能通过调控选择性剪接引入 PTC 并激活 NMD，从而实现基因转录后水平的定量调控，从而调节蛋白质的表达，这一过程被称为可调节的无效剪接和翻译（regulated unproductive splicing and translation，RUST）。目前 RUST 机制已在从酵母到人类的多种物种中得到证实，参与了大量基因的表达调控。例如血清反应因子 SRF 有多种选择性剪接形式，在其变异体 SRF-Δ3 中出现 PTC，从而激活 NMD，SRF 蛋白可以通过 RUST 机制调节自身基因的表达水平。最近许多研究发现，RUST 机制在 SR 蛋白和 hnRNP 家族等剪接调控因子的自我调控中出现得最为频繁。

人们对 RNA 的剪接过程已认识得比较清楚，但是在选择性剪接中剪接位点的选择机制仍不太清楚，有多种剪接调控因子通过与剪接元件的识别以及蛋白质间相互作用参与了剪接位点的识别，而 AS-NMD 对剪接调控因子的调控使这一过程变得更加错综复杂，这已成为研究 AS-NMD 的最大难题之一。要想破解这一难题，只能从 RNA 剪接调控的基本机制入手，从大量基因的 AS-NMD 事件出发，不断总结归纳。AS-NMD 通过 RUST 机制调控基因表达，是真核生物基因不断进化的结果，深入研究 AS-NMD 和 RUST 的分子机制及其生物学功能有重要的意义。

参考文献

Chang YF, Imam JS, Wilkinson MF. 2007. The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. Annu Rev Biochem, 76: 51～74

Johnson JM, Castle J, Garrett-Engele P, et al. 2003. Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. Science, 302(5653): 2141～2144

Lareau L, Brooks A, Soergel D, et al. 2008. The coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay. Advances in Experimental Medicine and Biology, 623: 190～211

Lewis B, Green R, Brenner S. 2003. Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100(1): 189

McGlincy N, Smith C. 2008. Alternative splicing resulting in nonsense-mediated mRNA decay: what is the meaning of nonsense? Trends in Biochemical Sciences, 33(8): 385～393

Modrek B, Resch A, Grasso C, et al. 2001. Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes. Nucleic Acids Res, 29(13): 2850～2859

Noensie EN, Dietz HC. 2001. A strategy for disease gene identification through nonsense-mediated mRNA decay inhibition. Nat Biotechnol, 19(5): 434～439

Perrin-Vidoz L, Sinilnikova OM, Stoppa-Lyonnet D, et al. 2002. The nonsense-mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination co-

dons. Hum Mol Genet, 11(23):2805～2814

Zavolan M, Kondo S, Sch nbach C, et al. 2003. Impact of alternative initiation, splicing, and termination on the diversity of the mRNA transcripts encoded by the mouse transcriptome. Genome Research, 13(6B): 1290～1300

Zhang X, Azhar G, Huang C, et al. 2007. Alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay regulate gene expression of serum response factor. Gene, 400(1-2): 131～139

撰稿人:廖成功　陈志南
第四军医大学

上皮-间质转化如何影响肿瘤进程

Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer Progression

上皮-间质转化（epithelial-mesenchymal transition，EMT）是指上皮细胞表型丢失，逐渐获得间质细胞特性，并获得迁移能力的生物学过程。在 EMT 过程中，上皮细胞标志物如 E-钙黏素（E-cadherin）、紧密连接蛋白 ZO-1 等会发生下调，而间质细胞标志物如波形蛋白（vimentin）、N-钙黏素（N-cadherin）和α-平滑肌动蛋白（α-SMA）等因子表达上调，β-连环蛋白（β-catenin）发生转位入核，细胞间连接崩解，细胞形态由鹅卵石样向梭形转变（图 1）。由于细胞与细胞之间以及细胞与基底膜之间的连接逐渐降解，使得细胞可以从原位置脱离；加之细胞的运动能力增强，上皮细胞则转化成可以迁移至别处的间质细胞。

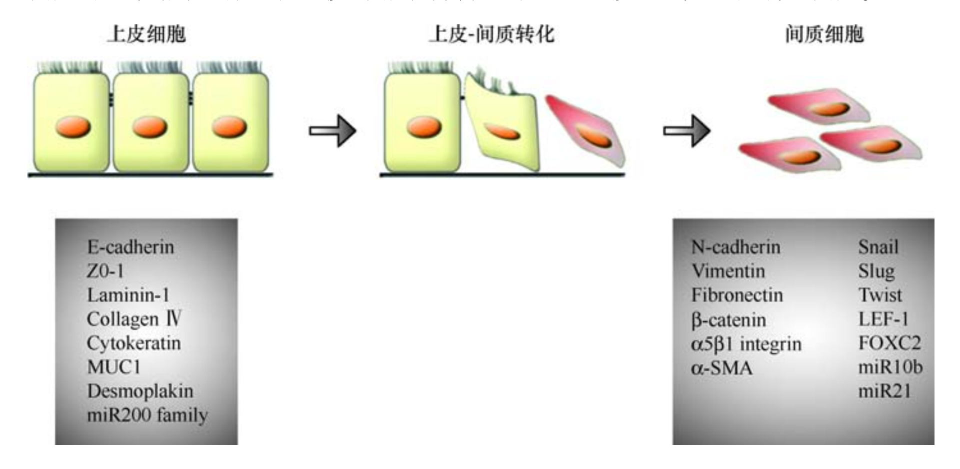


图 1　上皮-间质转化过程伴随着细胞标志物的变化

EMT 最早是由发育生物家观察到的现象。1908 年，Frank Lillie 观察到参与鸡胚发育的上皮细胞和间质细胞会出现相互转换的现象。19 世纪 60 年代，Elisabeth Hay精确地描述出在鸡胚原肠形成时，上皮细胞必须经过转换之后移动形成原条。而直到 1982 年，Garry Greenburg 和 Elisabeth Hay 进行细胞实验证明，上皮细胞的确会暂时丧失细胞极性，并且表现出具有迁移能力的间质细胞特性。至此，EMT 这个名称才被正式提出，并逐渐在发育生物学、肿瘤生物学等研究领域引起了广泛的关注。

EMT不仅参与了胚胎的发育和器官形成过程，还参与了组织重建和器官纤维化。并且，由于EMT中上皮细胞会失去细胞极性，丢失细胞间紧密连接和黏附连接，获得浸润性和迁移能力，EMT被认为在肿瘤发生、侵袭和转移的整个进程中均起到了重要作用。

EMT与癌症进展密切相关，成为目前肿瘤生物学研究的热点。在成体中，EMT是上皮细胞癌浸润转移的一个重要途径。体内和体外实验证据均表明，EMT在乳腺癌、前列腺癌、肺癌、肝癌、胰腺癌和结肠癌等多种癌症的原发性浸润和继发性转移中起着举足轻重的作用。因此，研究EMT的发生和调控机制，对于寻找治疗恶性肿瘤细胞转移的目标靶点有着重要的意义。

然而，EMT在癌症发生发展中的作用机制研究存在着很多难点。一方面，相较于体外诱导的EMT现象，体内的EMT现象并不是那么容易“捕获”的。恶性肿瘤及处于癌前病变的器官多具有不同于正常器官的复杂多变的微环境。而癌症之所以会发生、侵袭和转移，也是癌前病变细胞或肿瘤细胞与机体的微环境相互作用的结果。研究表明，EMT现象其实是短暂并且可逆转的。继发性肿瘤细胞到达新的位置后常常重新表达E-钙黏素，重新获得上皮样表型，从而更加有利于继发性癌组织实体的形成。这一EMT的反过程被称为间质-上皮转化（mesenchymal-epithelial transition，MET）。正是由于EMT的短暂性以及MET的存在，为研究人员在体内寻找EMT与转移的直接证据带来了障碍。

另一方面，EMT过程涉及复杂的分子机制。多种细胞因子如肝细胞生长因子（hepatocyte growth factor，HGF）、表皮生长因子（epithelial growth factor，EGF）、成纤维细胞生长因子（fibroblast growth factor，FGF）和转化生长因子-β（transforming growth factor β，TGF-β）等均可参与诱导上皮细胞、上皮来源的肿瘤细胞发生EMT。而某些肿瘤内部的缺氧、缺血环境也可诱导EMT的发生。正因为EMT诱导因素的复杂性，其涉及的通路也是错综复杂的。研究表明，EMT发生涉及的通路包括受体酪氨酸激酶Ras-MAPK途径、Src激酶、Rho家族激酶、PI3K/Akt途径、Smads通路、Wnt等信号通路及其下游多种转录因子。这些信号通路往往并不单独发挥作用，而是彼此联系，形成复杂的分子调控网络。例如，TGF-β已被证明是体内诱导EMT发生的重要因素，且在体外实验中，可诱导多种上皮肿瘤细胞发生EMT现象。TGF-β诱发EMT，除具有经典的TGF-β/Smads信号通路参与外，也伴随Smads非依赖的通路参与。有证据表明，在小鼠乳腺上皮细胞中，p38 MAPK和RhoA介导了TGF-β自分泌所引起的EMT现象。而在肝细胞中，Ras可激活抗凋亡的信号通路PI3K/Akt，使TGF-β诱导凋亡的作用受到抑制，转而发挥促进癌发生的作用。今后，科学家们将更多地关注多条信号通路如何实现协调合作，共同在EMT过程中发挥作用。

在临床上，EMT 过程中的生物标志物可用于肿瘤患者的筛选、预后判断及靶向治疗目标的锁定，对其机制的研究也为对癌症进程特异性环节进行靶向性治疗提供了可能。美国科学家 Robert A Weinberg 的研究组发现，发生 EMT 的乳腺上皮细胞和乳腺癌细胞具有干细胞样属性。Piyush B Gupta 等使用高通量筛选的方法从 16 000 种化合物中找出了能特异性杀伤 EMT 细胞的化合物，其中沙利霉素对 $CD44^{high}/CD24^{low}$ 乳腺癌干细胞的杀伤能力比常用的乳腺癌化疗药物紫杉醇强百倍。Michal Mego 等研究人员从乳腺癌患者外周血中捕获在肿瘤转移过程中具有重要作用的循环肿瘤细胞，找出了与 EMT 相关的 5 个基因：TWIST1、SNAIL1、SLUG、ZEB 和 FOXC2。他们发现，在 21% 的患者中，这些基因中至少有一个存在过度表达的情况。这样的新型检测方法不仅可以实时监测肿瘤治疗效果，提供新的重要预后信息，并且为乳腺癌的治疗提供了新靶点。我们相信，随着研究的不断深入，EMT 影响肿瘤发生、侵袭、转移的复杂分子机制也将得到逐步揭示，这将为治疗癌症提供新的思路和方法。

参 考 文 献

Gupta PB, Onder TT, Jiang G, et al. 2009. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. Cell, 138(4): 645～659

Kalluri R. 2009. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. J Clin Invest, 119(6): 1417～1419

Kalluri R, Weinberg RA. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. J Clin Invest, 119(6): 1420～1428

Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. 2008. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. Cell, 133(4): 704～715

Zhang YE. 2009. Non-Smad pathways in TGF-β signaling. Cell Res, 19(1): 128～139

撰稿人：吴　佼　边惠洁

第四军医大学

锌指核糖核酸酶——细胞基因组微创手术刀

Zinc Finger Nuclease—Minimally Invasive Scalpel on Cell Genome

细胞基因组上的改变是人类遗传与疾病的核心本质，肿瘤的发生归根结底就是肿瘤基因或肿瘤抑制基因的异常所致。因此，若能从基因水平改变肿瘤的遗传背景，不仅可能提高肿瘤细胞化疗、放疗的敏感性，同时更能从根本上改变肿瘤的遗传性状，达到控制肿瘤的发生、减少肿瘤的复发和转移的目的。传统的肿瘤基因治疗，人们选用病毒载体携带肿瘤抑制基因，但是这种方法在引入新的抗肿瘤基因的同时，有可能因病毒载体随机插入到宿主细胞基因组而导致新的肿瘤基因出现，或引起细胞整个基因组的不稳定，从而起不到预期的目的。因此，为了安全起见，一些可以阻断肿瘤细胞基因组 DNA 至 mRNA 的转录，或抑制 mRNA到蛋白质的翻译的方法如反义核酸、SiRNA、核酶（ribozyme）和 DNA 酶（DNAzyme）不断完善发展。但是这些方法都没有从根本上改变肿瘤基因组的遗传信息，那么是否有更加合理的方法直接从细胞的遗传信息库——基因组水平修饰、编辑变异基因，从而达到控制或消除疾病的目的呢？

锌指核糖核酸酶（zinc finger nuclease，ZFN）的出现和应用就能理想地回答这个问题。该技术可以针对细胞中特定的基因位点进行切割，引起基因组 DNA 双链的断裂，之后细胞启动自身的修复系统进行修复。当提供同源“修正序列”的情况下，依照同源重组原理修复变异基因，从而实现指定部位的碱基替换，达到在基因组水平上彻底改变导致疾病的遗传基因。所谓 ZFN，是由一个 DNA 识别域和一个非特异性核酸内切酶构成，其识别域是由一系列 Cys_2-His_2 锌指蛋白串联组成，每个锌指蛋白识别并结合一个特异的三联体碱基。锌指蛋白源自转录调控因子家族，在真核生物中从酵母到人类广泛存在，可形成 α-β-β 二级结构。其中 α 螺旋的十六氨基酸残基决定锌指的 DNA 结合特异性，骨架结构保守。对决定 DNA 结合特异性的氨基酸引入序列的改变可以获得新的 DNA 结合特异性。现已公布的从自然界筛选和人工突变的具有高特异性的锌指蛋白可以识别 GNN 和 ANN 以及部分 CNN 和 TNN 三联体。多个锌指蛋白可以串联起来形成一个锌指蛋白组识别一段特异的碱基序列，具有很强的特异性和可塑性，很适合用于设计 ZFN。与锌指蛋白组相连的非特异性核酸内切酶来自 FokⅠ的 C 端的 96 个氨基酸残基组成的 DNA 剪切域。FokⅠ是来自海床黄杆菌的一种限制性内切酶，只在二聚体状态时才有酶切活性，每个 FokⅠ单体与一个锌指蛋白组

相连构成一个 ZFN，识别特定的位点，当两个识别位点相距恰当的距离（6～8 bp）时，两个单体 ZFN 相互作用产生酶切功能。从而达到定点剪切基因组 DNA 的目的（图 1）。DNA 的剪切需要两个 FokⅠ切割区域的二聚化和至少一个单元结合 DNA。

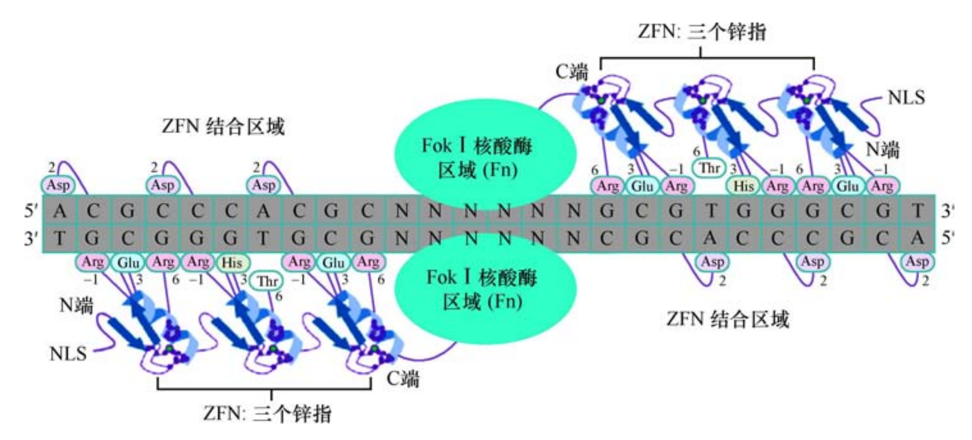


图 1　特定的 ZFN 与 DNA 结合示意图

其中，ZFN：三个锌指就是设计的 ZFN，它们可以准确地结合到如图 1 所示的 DNA 位置上。目前，最为成功的识别序列是 5′-GNN-3′，上面的序列符合 5′-NNC NNC NNC NNNNNN GNN GNN GNN-3′特征（N 为任意碱基）。

人类细胞基因组约含 30 亿个碱基对，目前重组 ZFN 基本上可以涵盖整个基因组。正因为它具有修正细胞基因组的准确性和特异性，使得 ZFN 进一步应用到生物医药领域。Elena 等报道利用该方法准确编辑 $CD4^+$ T 细胞的基因组后，从而使得该细胞对 HIV-1 抵抗。因 HIV 感染的辅受体 CCR5 基因编码区 32 个碱基的纯合性缺失（CCR5D32）就会导致 HIV-1 抵抗，因此 Elena 等选用特定的 ZFN 来破坏内源性 CCR5，结果显示瞬时转染 ZFN 后，$CD4^+$ T 细胞中大约 50% 的 CCR5 基因被永久性地破坏。小鼠移植修饰的 T 细胞后，发现病毒载量明显下降。该方法可能是今后临床中给 HIV 患者自体移植修饰的 $CD4^+$ T 细胞来治疗 HIV-1 感染的有效途径。Urnov 等针对 IL2R 基因突变引起的严重免疫缺陷症设计了四指 ZFN，该 ZFN 介导了 IL2R 基因的高效修复，在无选择压力下修复效率达 15%～18%。结果显示，在体内修正后的 T 细胞比原来的突变细胞更具有选择优势，故这样的修复效率已足够用于基因治疗。与逆转录病毒等技术相比，ZFN 没有基因重组的风险，因为它从根本上修正错误的序列，而非简单地增加一个正确的拷贝。

锌指核糖核酸酶在其他研究领域的应用：

（1）在多能干细胞方面：ZFN 介导的基因组编辑也显示了良好的应用前景。

传统的修饰干细胞一般是用同源重组，但由于干细胞具有自我更新和定向分化潜能，且同源重组的效率低，因此进行干细胞基因组的操作非常困难。而 ZFN 能提高重组的效率 100 倍左右。用 ZFN 在基因组的特定位点产生断裂后，加入外源的修饰基因，该基因只需要很短的同源臂就能达到很高的重组效率，从而快速准确地修饰多能干细胞。这些修饰的细胞不仅可用于纠正遗传性疾病，或用于修复、再生由创伤或疾病造成的组织和器官损伤，同时对阐明体细胞重编程、多能干细胞自我更新和定向分化的分子调控机制以及很多遗传性疾病的治疗带来了新的途径和希望。

（2）在基因治疗方面：传统的基因治疗的方式主要有两种，一种是利用病毒携带完整的基因序列送入人体内或者是注入一小段正确的 DNA 序列来修正错误或者使错误的基因不表现，正如前述，事实上人们无法确认这些方法在实际应用中的效率及安全性。而借由同源互换的原理使得细胞自行修正错误的 DNA 序列是发展基因治疗上最基本的原则。这一过程通过两个独立的步骤完成：首先在 DNA 中引入一个双链断裂，启动细胞自身的修复系统；之后“同源重组”参考引入的相似序列作为模板修复这段基因，从而实现指定部位的碱基替换。

（3）在肿瘤化疗方面：肿瘤细胞的多药耐药是肿瘤化疗的主要障碍。自从发现多药耐药基因及其分子机制后，如何提高造血干/祖细胞内与耐药有关的蛋白质或酶的水平，已经成为肿瘤基因治疗研究中的一个热点。利用 ZFN 技术在细胞的基因组进行灭活和引入特定的免疫相关基因，不仅能增强肿瘤细胞的免疫原性，同时也能提高肿瘤免疫治疗的效果。如用该策略在抗原提呈细胞引入并提高特定肿瘤细胞表达细胞因子，共刺激分子（B7）和黏附分子等则有可能提高肿瘤免疫治疗效果。

（4）研究生物发育过程方面：报道显示，ZFN 在基因组水平成功敲除了斑马鱼的血管内皮生长因子 2 的受体 KDR，并观察到了其相应的表型变化，表明了该方法在模式生物基因组上操作的有效性。ZFN 目前亦成功用于增强非洲爪蟾卵细胞、线虫、果蝇及斑马鱼细胞的同源重组。在斑马鱼中，30%～50% 的个体将 ZFN 诱导的突变传给了子代，而 7%～18% 的子代为突变型。通过 SOLEXA 测序发现，在形态正常的胚胎中，脱靶现象仅出现 1%。在植物上，Lloyd 等在拟南芥中用 ZFN 诱导了染色体基因的定点突变，后代的突变率高达 20%。分子检测表明 20% 的重组事件是精确的，没有伴随碱基的缺失或插入。这一结果再次表明用 ZFN 定点切割染色体 DNA，可以显著提高同源重组介导的基因定点整合效率，这为基因定点整合和置换提供了一个非常有潜力的工具。

ZFN 编辑应用问题：靶向基因组的编辑和操作应用于实际的科研或医疗中，需要有极其高度的特异性，即要避免错误的酶切即脱靶（off-target）。但由于蛋白质和基因相互作用的复杂性（疏水作用和构象改变的复杂性），目前暂没有任

何好的软件可以准确地预测其相互作用。虽然现在有大量的有效的ZFN的报道和验证，但就具体的切割位点来讲，仍然需要大量的实际验证，从而最大限度地降低其非特异性（unspecificity）的切割和因为脱靶效应而导致的细胞毒性。

综上所述，采用ZFN定向编辑细胞基因组，已经有了很好的基础。同时该策略能定向给基因组的任何位置引入感兴趣的目标基因，这对瘤等相关基因疾病的临床治疗具有重要的意义。该策略在体外目前已经充分证明了其可控性和有效性。由于其能对细胞基因组进行编辑和修饰，采用ZFN进行特定位点的切割，然后加入正常的基因进行置换，从而促使肿瘤细胞发生凋亡或恢复其正常细胞功能。对于癌基因的异常（过度激活），也可直接采用ZFN进行特定位点切割并彻底灭活该基因，从而达到恢复细胞的正常功能或使肿瘤细胞凋亡。用锌指核酸酶编辑基因组的方法是否能作为肿瘤综合治疗的一部分目前正在临床研究中，但无疑该方法的不断拓展和应用将为肿瘤的基因治疗带来无限美好的前景。

参考文献

Beumer K，Bhattacharyya G，Bibikova M，et al. 2006. Efficient gene targeting in Drosophila with zinc-finger nucleases. Genetics，172(4)：2391～2403

Chan CW，Khachigian LM. 2009. DNAzymes and their therapeutic possibilities. Intern Med J，39(4)：249～251

Kandavelou K，Mani M，Durai S，et al. 2005. "Magic" scissors for genome surgery. Nat Biotechnol，23(6)：686～687

Kim YG，Cha J，Chandrasegaran S. 1996. Hybrid restriction enzymes：zinc finger fusions to Fok Ⅰ cleavage domain. Proc Natl Acad Sci USA，93(3)：1156～1160

Perez EE，Wang J，Miller JC，et al. 2008. Establishment of HIV-1 resistance in $CD4^+$ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. Nat Biotechnol，26(7)：808～816

Pingoud A，Silva GH. 2007. Precision genome surgery. Nat Biotechnol，25(7)：743～744

Porteus MH，Carroll D. 2005. Gene targeting using zinc finger nucleases. Nat Biotechnol，23(8)：967～973

Subramanya S，Kim SS，Manjunath N，et al. 2010. RNA interference-based therapeutics for human immunodeficiency virus HIV-1 treatment：synthetic siRNA or vector-based shRNA? Expert Opin Biol Ther，10(2)：201～213

Urnov FD，Miller JC，Lee YL，et al. 2005. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. Nature，435(7042)：646～651

撰稿人：杨向民　陈志南

第四军医大学

聚糖-蛋白质相互作用中的特异性硫酸化编码信息

The Sulfation Code Involving in GAG-Protein Interactions

所有细胞和许多天然蛋白分子外表面都带有致密而复杂的聚糖链。聚糖与蛋白分子间的相互作用涉及许多重要的生物学功能，是当今糖生物学中很吸引人的研究领域。由聚糖-蛋白质相互作用所介导和调控的许多生理病理现象近年来引人瞩目，并逐渐成为临床治疗潜在的靶标。要设计开发有效干预此类相互作用的创新药物，必须详细地解码聚糖-蛋白质相互作用的具体分子细节。

聚糖-蛋白质相互作用始于 20 世纪 30 年代关于溶菌酶对细菌肽聚糖的裂解研究，但最早提出蛋白质可以专一识别聚糖的概念，可以追溯到 19 世纪末 Emil Fisher 提出的酶催化理论——“钥匙-锁”模型。后来随着溶菌酶、刀豆蛋白、流感病毒血凝素及大量肝素结合蛋白晶体结构的不断测定，人们分析发现，很难从不同的聚糖结合蛋白的一级结构中找出共同的编码序列模体（motif）。而要从立体构象上阐明两者结合的特异性和亲和力，取决于对聚糖中糖残基的特异修饰及差向异构排列所形成空间结合结构域的深入认识。

以真核细胞的蛋白聚糖（proteoglycan，PG）家族为例，其成员由 1 条或多条带负电荷的糖胺聚糖（glycosaminoglycan，GAG）链通过共价键与 1 个特定的核心蛋白连接而成。由氨基糖和糖醛酸二糖单元重复聚合而成的 GAG 直链多糖在不同位点存在着硫酸化修饰（聚透明质酸除外）（图 1A）。由于 GAG 链在不同 PG 核心蛋白上的连接数目变化不一。具体到某一特定 PG，其核心蛋白对所有可能的 GAG 连接位点的利用程度并不相同。而且，某些位点既可连接硫酸软骨素（chondroitin sulfate，CS），也可连接硫酸肝素（heparan sulfate，HS）。此外，GAG 链的长度也不尽相同，链上具体的硫酸化修饰的空间排列也变化多端。加之细胞产生蛋白聚糖，或分泌到胞外基质，或插入细胞质膜，或储存在分泌颗粒内，不同的转运定位导致其 GAG 链的硫酸化程度也不同。最后，源自不同类型细胞的同种 PG，其 GAG 侧链的数目、长度及其微细结构也有差异。上述种种因素导致 PG 尤其是 GAG 侧链呈现出比 DNA 和蛋白质序列更为复杂的序列和结构多样性，而这些复杂的多样性变化使得聚糖-蛋白质间相互作用的研究陷入困境。

哺乳动物细胞表面 PG-GAG 侧链高度的负电荷决定了其可与生长因子及其受体、趋化因子、细胞外基质蛋白等一大批配体相互作用，从而涉及细胞的稳态

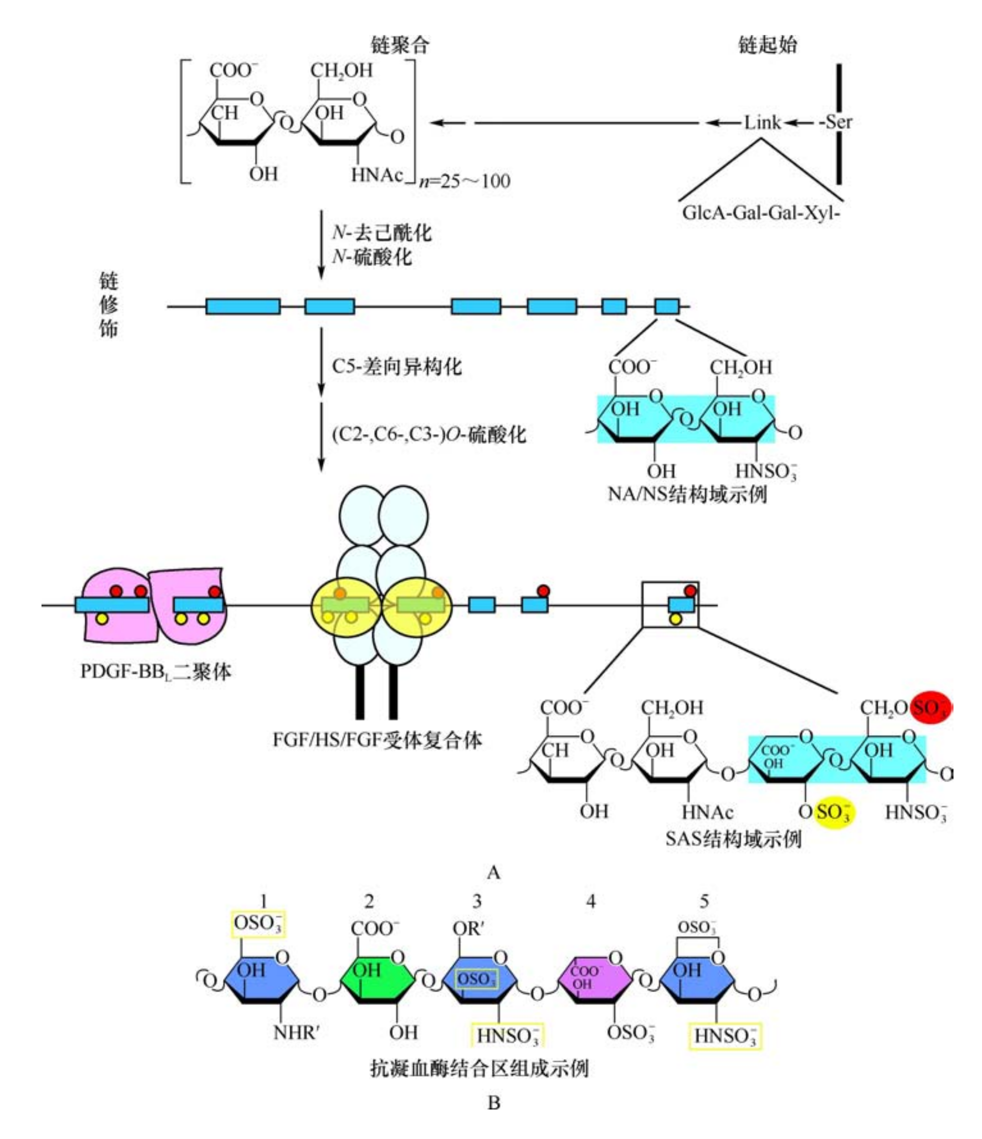


图 1　硫酸肝素的生物合成过程及修饰反应排列形成的特异结构域

A. 硫酸肝素合成起始于木糖转移酶等催化将四糖连接到核心蛋白丝氨酸残基，随后由 α-GlcNAc 转移酶和 β-GlcA 转移酶催化形成重复的二糖单元，当聚合反应进行时，GlcNAc *N*-脱乙酰酶/硫酸基转移酶、GlcA C5 差向异构酶、C2（黄色）/C6（红色）/C3-*O*-硫酸基转移酶催化一系列非均一性修饰反应，最终导致由硫酸化残基和糖醛酸差向异构排列形成的专一性配体结合结构域。B. 抗凝血酶结合结构域由三个 GlcN（蓝色）、一个 GlcA（绿色）和一个 IdoA（红色）组成，四个黄框标记的硫酸基修饰对其与抗凝血酶高亲和力结合十分必需。其中，中间 GlcN 单元内的 3-*O* 位硫酸修饰在此结构域以外十分罕见，是抗凝血酶结合序列的特异性标签

平衡、胚胎发育、肿瘤、炎症、血管生成、淀粉沉积病等多种生理病理过程中的诸多关键事件。迄今已知与 GAG 结合的几百种蛋白质，大多数可与 HS 结合（表 1），这反映出 HS 具有相当大的化学多样性和反应能力。通过硫酸化修饰的糖残基的不同空间排列，GAG 或 HS 可与不同类蛋白质发生特定的相互作用，这类相互作用有着意义深远的生理效果。其中，最著名的两个实例：一是静脉注射肝素由于结合和活化抗凝血酶，导致迅速产生抗凝作用；二是成纤维细胞生长因子（FGF）与肝素结合显著增强了 FGF-受体的信号转导刺激。从功能角度讲，HS 侧链与蛋白配体间相互作用可引起：①在细胞表面特定位点固定和浓缩配体；②调节与 HS 结合酶类的活性；③将结合的配体提呈给其信号受体；④防止配体产生降解；⑤作为循环配体的储存库。无论是仅作为支架分子或配体运载体，还是直接激活或作为共受体激活下游信号，GAG 与许多蛋白质的相互作用特异地依赖于 GAG 链中糖残基修饰的特殊排列，如抗凝血酶与肝素结合取决于肝素的五糖序列的专一性修饰（图 1B），但也有些蛋白质则显得并不严格依赖于这些所谓的特定修饰编码。

表 1　GAG-结合蛋白及其生物活性举例

蛋白质	GAG	结合生理效应
抗凝血酶	肝素/HS	系统的抗凝作用
肝素辅助因子Ⅱ	DS 和肝素	局部的抗凝
组织纤溶酶原激活剂	肝素/HS	血块溶解
成纤维细胞生长因子	肝素/HS	促有丝分裂
肝细胞生长因子	肝素/HS	促有丝分裂
细胞因子 IL-8/MIP-1b	肝素/HS	炎症
L-和 P-选凝素	肝素/HS	炎症
细胞外超氧化物歧化酶	肝素/HS	宿主防卫
脂蛋白脂酶	肝素/HS	局部的脂解和周转
载脂蛋白 E	肝素/HS	清除脂蛋白
纤连蛋白	肝素/HS	细胞黏附
层粘连蛋白	肝素/HS	细胞黏附
Ⅴ型胶原	肝素/HS	细胞黏附
血小板反应蛋白	肝素/HS/CS	细胞黏附/生长
CD44	聚透明质酸	细胞黏附/移动
RHAMM	聚透明质酸	细胞黏附/移动
聚集蛋白聚糖	聚透明质酸	软骨形成

迄今，我们仍然难以理解聚糖-蛋白质相互作用的功能特异性与GAG结合结构域中糖残基修饰组织形式间的对应关系。图2以HS链内的硫酸化修饰为例，将这方面大量分散的信息梳理成各种可能的相互作用模式。最初，研究者对聚糖-蛋白质相互作用的简单推测，来自抗凝血酶结合域内稀有的3-*O*硫酸化修饰现象，即硫酸肝素结合结构域中稀有的糖残基修饰完全决定了二者相互作用的特异性（图2A）。然而，对于如FGF家族分子等其他一些蛋白质，其与HS的相互作用、结合则完全基于普通的糖残基修饰，很可能是非特异性的。这些蛋白质与HS相互作用、结合的强度随着硫酸化修饰水平的增加而增加（图2B）。当然，这种总体上的非特异性，并不排除特定类型（*N*-、2-*O*-、6-*O*-）的硫酸化修饰对二者相互作用特异性或亲和力的贡献多于其他的普通糖残基修饰。这种非特异性模式的功能表型往往表现为广义范围内的可调节性响应，其能涵盖从简单的配体亲和力建立、成形素梯度分布、受体激活到胞内信号转导强度等方方面面。尽管如此，没有理由排除某些聚糖-蛋白质相互作用可能严格依赖于数个关键位置糖残基硫酸化修饰的特定排列的事实（图2C）。这类GAG链中关键位置糖残基硫酸化修饰的特定排列，可以看做是一种特异的序列编码信息。从统计学角度推测，随着HS链上整体硫酸化修饰水平的增加，其蛋白质结合结构域内随机或非随机性2-*O*-和6-*O*-硫酸化修饰所产生的特定排列的硫酸化修饰基团簇的可能性也将增加。目前这方面的研究积累还无法确证2-*O*-和6-*O*-硫酸化修饰在这种特异编码序列中的相对重要性，但细胞可能基于这种特异的硫酸化修饰编码序列信息，指导调节HS与配体的相互作用细节，继而或通过数个细胞表面受体，或通过硫酸肝素共受体功能来调变细胞内的一系列信号响应。显然，要通过体外表达的聚糖和蛋白质复合体的结晶分析，或人工合成聚糖库后进行蛋白质结合分析等手段，是难以类推细胞内这种预定的硫酸化修饰编码序列的真实生物医学意义的。利用硫酸化修饰转移酶特异性敲除和针对不同-*O*-硫酸化修饰表位抗体封闭等手段也许能更好地探知这种硫酸化修饰编码序列的详细信息。不容忽视的细节是，细胞表达HS链的冗余性有可能会让处理后细胞的最终表型或信号响应难以鉴定。

相对于蛋白质-蛋白质相互作用研究，目前关于聚糖-蛋白质相互作用研究的实验技术平台国外也才刚刚起步，聚糖-蛋白质相互作用的许多分子细节还需要加速和深入阐明。无论是基于靶受体激活/失活考虑，还是基于内源性配体竞争考虑，这种隐匿在聚糖链中的特异性-*O*硫化修饰编码信息对于聚糖类选择性药物的研发将会有不可估量的特别意义。

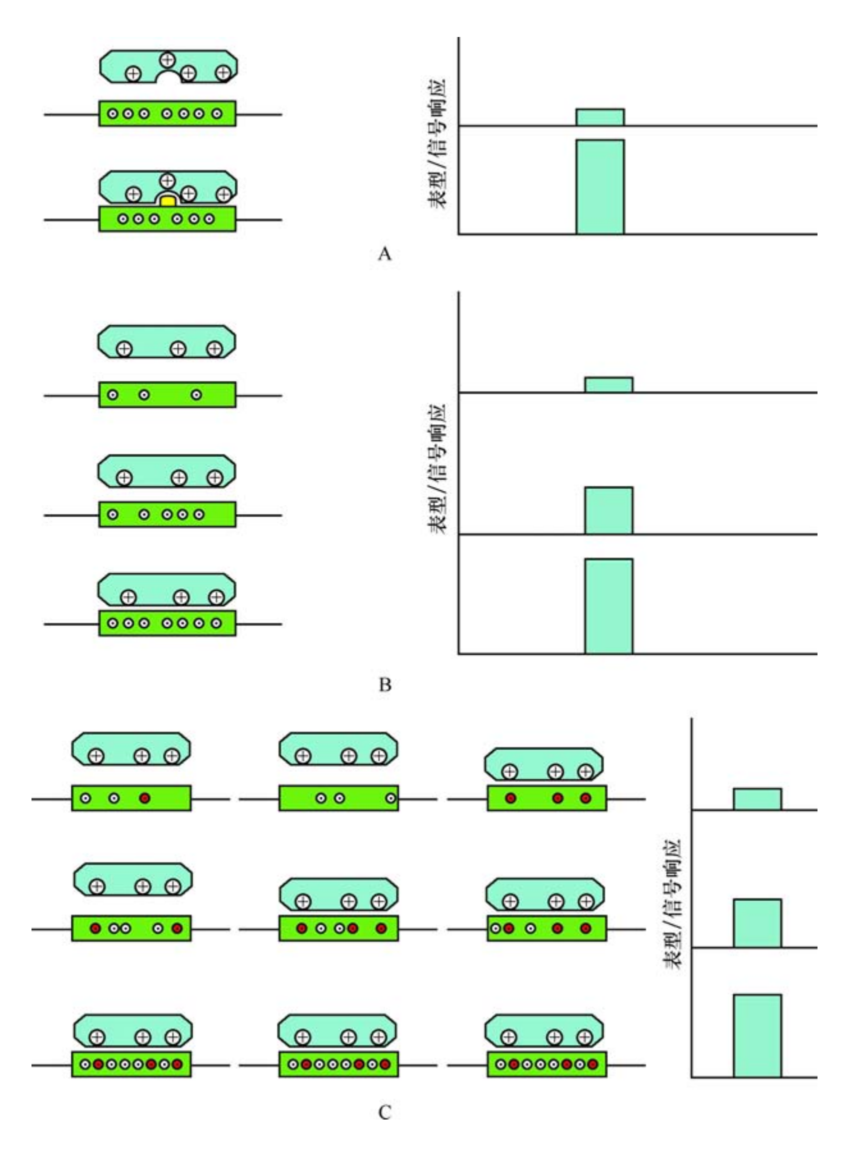


图 2 硫酸肝素-蛋白质相互作用中特异修饰编码与其引发的生物学效应关系

A. 两者相互作用、结合依赖于稀有的残基修饰（标黄所示，见图 1B 抗凝血酶例子中葡糖胺的 3-*O*-硫酸化）。稀有残基修饰的有或无最终外显为生物学表型或信号响应的有或无。B. 两者相互作用、结合完全基于普通的聚糖组分，即依赖于 HS 链的整个负电荷密度而不是特异性硫酸化修饰的排列定位。HS 链整体硫酸化水平的变化可被“翻译”成可调节的表型或信号响应。C. 两者相互作用、结合涉及“隐匿”的序列特异性，即依赖于关键硫酸化修饰的特定排列（标红所示）。只有那些含有关键硫酸化修饰特定排列的结构域可促进表型或功能性响应。产生这类特定排列的关键硫酸化修饰随着链修饰反应总体硫酸化水平的增加而增加。对于完全硫酸化（“肝素样”）的结构（最底部模型），所有类型的相互作用都可能同时存在

参考文献

Bishop JR, Schuksz M, Esko JD. 2007. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. Nature, 446(7139): 1030～1037

Kreuger J, Spillmann D, Li JP, et al. 2006. Interactions between heparan sulfate and proteins: the concept of specificity. J Cell Biol, 174(3): 323～327

Lindahl U. 2007. Heparan sulfate-protein interactions—a concept for drug design. Thromb Haemost, 98(1): 109～115

Lindahl U, Li JP. 2009. Interactions between heparan sulfate and proteins-design and functional implications. Int Rev Cell Mol Biol, 276: 105～159

Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al. 2009. Essentials of Glycobiology. 2nd ed. Cold Spring Harbor(NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press

Wittrup A, Zhang SH, ten Dam GB, et al. 2009. ScFv antibody-induced translocation of cell-surface heparan sulfate proteoglycan to endocytic vesicles: evidence for heparan sulfate epitope specificity and role of both syndecan and glypican. J Biol Chem, 284(47): 32959～32967

撰稿人:张思河
第四军医大学

哺乳动物胚胎细胞命运何时决定

When Was the Cell Fate Determined in Mammalian Embryo

胚胎细胞命运决定是发育生物学的基本问题，哺乳动物早期胚胎命运决定对研究细胞分化、模式形成、胚胎分割、人类辅助生殖等具有重要意义。1925 年，德国胚胎学家福格特首先应用活体染色的方法，仔细分析了两栖类胚胎各部的运动，绘制出胚胎预定命运图。

哺乳动物早期胚胎经过两次命运决定，在囊胚期分化形成具有三种细胞谱系的胚胎，着床后发育形成个体。小鼠胚胎第一次细胞命运决定起始于 8～16 细胞期，卵裂球出现极性，胚胎形态上出现致密化，卵裂球之间界限不清，形成桑葚胚。16～32 细胞期卵裂球位置也发生变化，位于中间的卵裂球将形成内细胞团（inner cell mass，ICM），而位于周边的将形成滋养外胚层（trophoectoderm，TE）。第二次细胞命运决定出现于早期囊胚发育至晚期囊胚阶段，内细胞团又分化形成上胚层（epiblast，EPI）和原始内胚层（primitive endoderm，PE）（图 1），上胚层主要形成胚体，而原始内胚层参与形成胚外组织。

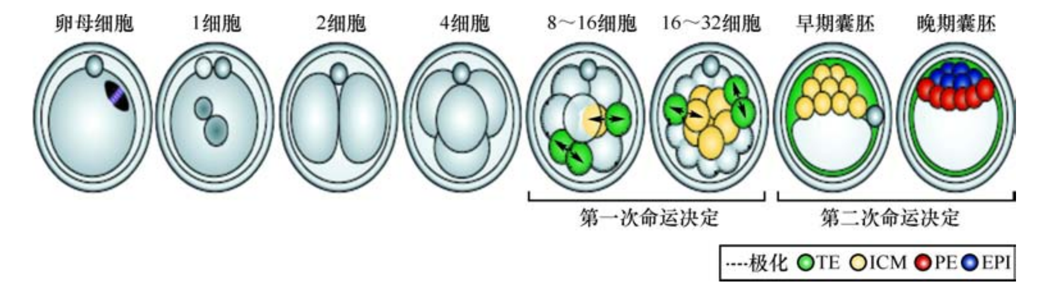


图 1　小鼠着床前胚胎的细胞命运决定

TE. 滋养外胚层；ICM. 内细胞团；PE. 原始内胚层；EPI. 上胚层

引自 Zernicka-Goetz M，et al. 2009. Nat Rev Genet

细胞内-外位置（inside-outside model）和细胞极性模型（cell polarity model）试图解释哺乳动物囊胚 ICM 和 TE 的分化（图 2）。在小鼠 16 细胞期，细胞位置决定了其命运。在晚期桑葚胚中位于外周的细胞将分化形成滋养外胚层，而位于中间的细胞将保持未分化的状态，即形成内细胞团（图 2A）。细胞极性模型提出在 8 细胞期，卵裂球的极性和分裂方式决定了 16 细胞期和随后细胞所处的位置。

对称分裂将产生 2 个位于外周的极性细胞［图 2B（a）］，不对称分裂产生 1 个外周细胞和 1 个中间细胞［图 2B（b）］。

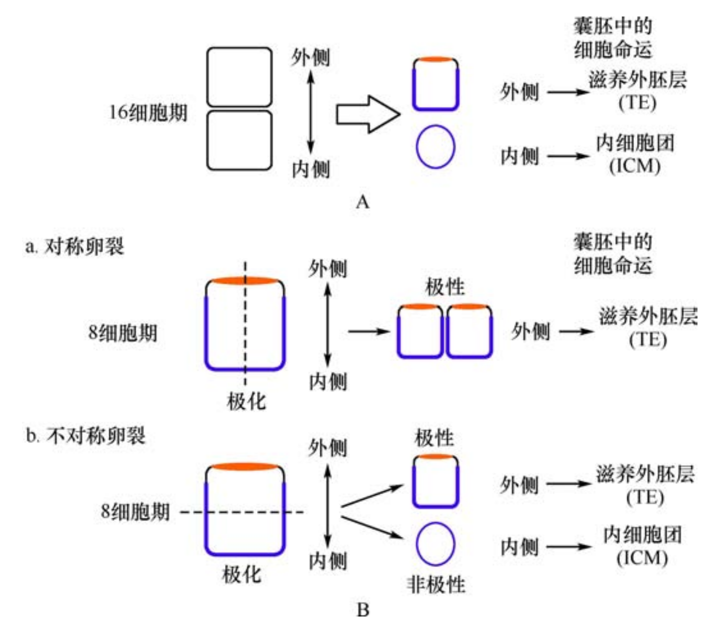


图 2　小鼠早期胚胎第一次细胞命运决定——内细胞团和滋养外胚层形成的两种假说

A. 细胞内-外位置模型；B. 细胞极性模型

引自 Yamanaka Y，et al. 2006. Dev Dyn

早期胚胎第二次命运决定是囊胚内细胞团分化形成 EPI 和 PE 的过程。目前提出了几种假设（图 3）。位置诱导（positional induction）假说认为，ICM 表面与囊胚腔接触的细胞接收诱导信号，分化形成 PE，这种诱导信号不能影响 ICM 深处的细胞。细胞分类（cell sorting）假说是基于实验观察，发现早期 ICM 中存在表达 PE 特异的转录因子 Gata6 和 EPI 特异的转录因子 Nanog 的细胞，可能 ICM 混合有 PE 和 EPI 的前体细胞，随后归类分布到各自的区域。诱导和分类（induction and sorting）假说是通过细胞示踪，发现在 PE 和 EPI 谱系分化过程中细胞运动和诱导都参与其中。而细胞社会流动性模型（social mobility model）综合了早期胚胎两次命运决定的研究，提出了更为复杂的过程（图 3B），认为不对称分裂很大程度上影响了细胞向 EPI 或 PE 的分化。第一批不对称分裂产生的几乎都是 EPI 谱系，第二批不对称分裂产生的大都是 PE 谱系细胞。大部分细胞产生时就处于正确的位置，未处于正确位置的细胞大都依靠肌动蛋白迁移至最终位置，还有少许细胞继续分裂参与 PE 和 EPI 形成。处于不正确位置且不迁移的细胞要么改变其基因表达，要么凋亡。所以，ICM 分化形成 PE 和 EPI 是通过细胞迁移、凋亡和改变基因表达等完成的。

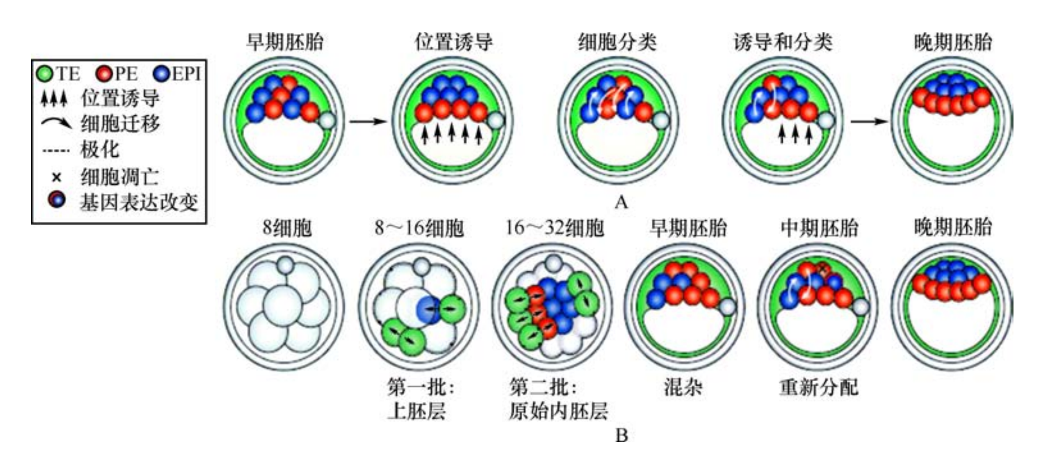


图3 小鼠早期胚胎第二次细胞命运决定——上胚层和原始内胚层形成的四种假说

A. 三种假说：位置诱导、细胞分类、诱导和分类假说；B. 细胞社会流动性假说

引自 Zernicka-Goetz M, et al. 2009. Net Rev Genet

低等动物的卵母细胞是不均质卵，第一次卵裂就决定了胚胎细胞今后的发育命运。如蛙卵受精后，与精子入卵点相对的动物半球出现灰色新月，第一次卵裂时沿蛙卵动-植物极通过灰色新月中央的分裂面，相当于未来成体的左右对称面。小鼠早期胚胎在8细胞之前，每个卵裂球都具有发育成个体的潜能，因此认为此时是小鼠早期胚胎细胞决定的时间。但近年来的研究表明，4细胞时期的小鼠胚胎每个卵裂球的发育能力不同，这与它们的分裂方式有关。活细胞示踪发现，2细胞的两个卵裂球可能就具备了不同的发育方向，先分裂的卵裂球将最终发育成囊胚的胚胎部分，而后分裂的主要贡献于囊胚的非胚胎部分和胚胎/非胚胎的交界区。精子入卵的位置（SEP）和第二极体（Pb2）可能决定了第一次卵裂面，大多数情况下继承了SEP的2细胞卵裂球将比另一个先分裂，第一次卵裂面也是囊胚时期胚胎和非胚胎区域的界限。因此，哺乳动物的命运决定可能很早，类似于低等动物。但也有研究反对以上观点，认为在小鼠囊胚形成之前并不存在模式预定。

目前对于哺乳动物早期胚胎的命运决定的时间和关键分子还没有确定，到底是什么决定了卵裂球的位置，最终决定了囊胚内细胞团和滋养外胚层的分化？内细胞团的产生是建立胚胎干细胞的基础，早期胚胎细胞命运决定的研究对了解胚胎干细胞的产生和未分化状态的维持起到重要作用，同时也是研究细胞分化和癌变的重要基础。胚胎细胞命运决定是一个复杂的过程，受到关键转录因子（如Oct3/4、Nanog、Cdx2、Sall4、TEAD4等）表达和染色质表观遗传的调控。卵裂球极性的产生可能是第一个步骤，极化使胞质中的极性分子（如PAR3、aPKC）和细胞器分布改变，产生不对称的分裂，改变卵裂球的分

裂方向和分布位置，影响转录因子表达，从而决定细胞分化的命运。具体机制仍有待研究。

参考文献

Dietrich JE ,Hiiragi T. 2007. Stochastic patterning in the mouse pre-implantation embryo. Development, 134:4219～4231

Dziadek M. 1979. Cell differentiation in isolated inner cell masses of mouse blastocysts in vitro: onset of specific gene expression. J Embryol Exp Morphol, 53:367～379

Meilhac SM, Adams RJ, Morris SA ,et al. 2009. Active cell movements coupled to positional induction are involved in lineage segregation in the mouse blastocyst. Dev Biol ,331:210～221

Piotrowska K, Zernicka-Goetz M. 2001. Role for sperm in spatial patterning of the early mouse embryo. Nature ,409(6819):517～521

Piotrowska-Nitsche K, Perea-Gomez A, Haraguchi S ,et al. 2005. Four-cell stage mouse blastomeres have different developmental properties. Development ,132(3):479～490

Rossant J, Chazaud C ,Yamanaka Y. 2003. Lineage allocation and asymmetries in the early mouse embryo. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 358:1341～1348

Rossant J. 1976. Postimplantation development of blastomeres isolated from 4- and 8-cell mouse eggs. J Embryol Exp Morphol ,36:283～290

Yamanaka Y, Ralston A, Stephenson RO ,et al. 2006. Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. Dev Dyn ,235:2301～2314

Zernicka-Goetz M, Morris SA, Bruce AW. 2009. Making a firm decision: multifaceted regulation of cell fate in the early mouse embryo. Nat Rev Genet, 10:467～477

撰稿人：雷　蕾
哈尔滨医科大学

先天畸形是怎么产生的

Congenital Malformation

先天畸形是指胚胎发育紊乱而表现的出生时即存在的器官或组织的体积、形态、部位或结构的异常或缺陷，常常累及多个不同器官或部位，如心、脑、肺、肝、脊柱、内脏等，是胚胎学的一个重要分支。先天畸形不等同于出生缺陷（birth defects），出生缺陷内涵更广一些，是指由于胚胎发育紊乱引起的形态、结构、功能、代谢、精神、行为等方面的异常，包括先天畸形、智力障碍、代谢性疾病等，因此先天畸形只是出生缺陷的一部分。在胚胎学发育的第 5 周是出生缺陷最高发时期，也是先天畸形的高危险期。其致病因素中，有遗传因素（占 20% ～25% ）、环境因素（占 7% ～10% ）、基因突变（占 7% ～8% ）和染色体异常（占 6% ～7% ）等，更多的是多种因素相互作用及原因不明的因素（占 50% ～60% ）（图 1）。任何一对夫妇，不论种族、年龄、收入或者居住地，都有生产先天畸形孩子的可能性。

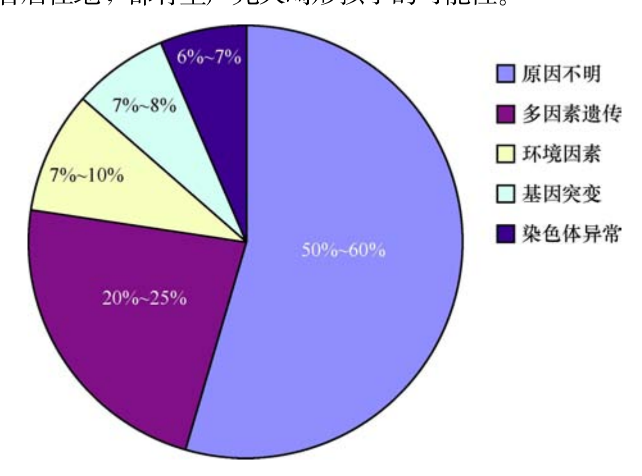


图 1　先天畸形致病因素

在欧美和一些发展中国家，先天畸形的发病率占到出生比例的 2% ～3% ，是围生儿死亡率最高的病因之一 。在北美，死于出生缺陷的新生儿占新生儿总死亡率的 20% 。其中最主要、最常见的先天畸形之一就是脊柱裂（spina bifida cystica），是神经管在胚胎发育过程中没有愈合所致，约占新生儿比例的 3% 。相当一部分先天畸形是在婴儿出生后一段时间才被发现的，所以先天畸形的发病率占 2 岁儿童人群的 6% ，5 岁儿童人群的 8% ，比率明显提高。我国卫生部 1987 年的监测结果显

示我国畸形发生率为1.3%，其中以神经管畸形和唇腭裂畸形的出现率最高。近年来，随着现代工业发展和环境污染的加重，先天畸形的发生率有上升趋势。

目前，先天畸形成了危害人类健康的严重疾患，受到世界各国的高度重视。国际上对先天畸形进行了广泛的监测和病因学调查，并开展深入的实验研究，取得了长足的进展，尤其是在遗传学因素和环境因素方面的研究进展很快。其中遗传学因素是目前能明确的最重要的致畸因素，约占1/3的先天畸形因此产生。目前已经确定的环境致畸因子主要有五类，即生物性致畸因子、物理性致畸因子、致畸性药物、致畸性化学物质和其他致畸因子。对人类胚胎有致畸作用的生物因子有单纯疱疹病毒、风疹病毒、巨细胞病毒、弓形体、梅毒螺旋体等，还有一些病毒，如流行性腮腺炎病毒、流感病毒等。目前已确认的对人类有致畸作用的物理因子有射线、机械性压迫和损伤等。有致畸作用的化学药物包括有些激素（性激素等）、抗肿瘤药（氨基蝶呤等）、抗生素（四环素等）及某些治疗精神病的药物（安非他明等）。在工业"三废"、农药、食品添加剂和防腐剂中，均含有一些有致畸作用的化学物质。其他致畸因子还包括酗酒、吸烟、咖啡因等。

减少先天畸形的关键在于预防，因此掌握致畸因素和了解胚胎发育过程中的致畸敏感期（susceptible period）显得尤为重要。致畸敏感期是指胚胎受到致畸作用最易发生畸形的发育阶段，现在普遍认为是受精后第3周至第8周。这个时期胚胎细胞增生、分化活跃，胚体形态发生复杂变化，是组织和器官的形成时期，最容易受到致畸因素的干扰而发生器官形态结构畸形。在此之前的阶段即受精后两周内受到致畸因素的影响则更容易引起死胎。

但是目前如何有效预防仍然是困扰人类最重要的难题之一，目前能做到的是尽量消除致病因素，包括出生前的遗传学检查及妊娠期孕妇避免接触环境致畸因子。随着生物医学模式向预防医学的转变，社区参与将在先天畸形的早期医教宣传、早期预防、早期诊断及早期干预等方面起到很大的作用，降低人群畸形的发病率，从而提高我国人口质量。

参考文献

成令忠．1995. 组织学与胚胎学．第4版．北京：人民教育出版社，328～333

高英茂．2005. 组织学与胚胎学．第5版．北京：人民卫生出版社，480～486

Moore KL，Persaud TVN. 2008. The Developing Human：Clinically Oriented Embryology. 8th ed. New York：Saunders Elsevier，457～486

撰稿人：梁春敏
复旦大学

卵子如何从亿万精子中识别一个精子并阻止其他精子的受精

How to Identify a Sperm and Prevent Other Sperms During Fertilization

哺乳动物在受精前首先要经历一个精卵识别的过程，此过程存在种的特异性。科学家发现人类精子存在独特的“基因签名”，好似一把钥匙，能够开启卵子的受孕之锁。此外，正常受精是一个精子进入一个卵子，形成双倍体受精卵。极少数情况下若发生双精受精，则形成 69 条染色体的三倍体胚胎，多数将发生流产，即使胎儿出生，不久也将死亡。在精子卵子发生受精反应时，卵子是如何识别同种属的精子，并阻止多精受精的发生，一直是科学研究的热点问题。

研究表明，卵子的透明带（zona pellucida，ZP）在阻止异种精子的受精和防止同物种的多精子受精中起着关键性的作用。1987 年，Wassarman 指出哺乳动物精子附着于卵子和精卵的特异性识别依赖于精子表面的糖蛋白和 ZP 糖蛋白的互补。ZP 糖蛋白有三种成分（ZP1、ZP2 和 ZP3），其中 ZP3 和精子质膜上的 ZP3 受体介导了精子与卵子透明带之间的初级识别，被认为是第一精子受体，能与顶体完整的精子结合，并诱发顶体反应；ZP2 与顶体反应的精子相互作用，构成精子与卵子透明带之间的次级识别和结合；ZP1 起连接 ZP2 和 ZP3 的作用。其次，透明带反应和卵膜阻断又防止了同物种的多精受精。当精子接触卵子时，在靠近卵细胞膜的胞质内，皮质颗粒的释放使透明带的结构与组分发生变化，对继续前来的精子结合能力降低，有效制止后续精子穿入透明带，此即透明带反应。同时，皮质颗粒的物质使卵表面细胞膜的结构改变和负电荷增多，制止其他精子细胞膜和卵膜的融合，这一现象称卵膜阻断，也达到阻止后继精子入卵的目的。ZP 的这些作用都是通过其表面的糖蛋白而起作用的。然而，对于 ZP 在精卵识别和结合中发生作用的各种机制，仍有大量的谜团尚待解开。

普遍的观点认为，精子与透明带蛋白的识别与结合依赖于精子质膜上的 ZP3 受体（RSP）与 ZP 糖蛋白的 *O*-寡糖侧链（其末端为 α-1,3-半乳糖）或 *N*-乙酰胺基葡萄糖。但是也有研究发现缺乏 α-1,3-半乳糖所必需的半乳糖转移酶的雌性小鼠也能够受精。目前尚未研究精子头部浆膜上能识别并结合 ZP3 寡糖链的结合

蛋白，且对卵子ZP3上的寡糖链也缺乏了解，如其组成成分、序列排布及与不同哺乳动物ZP3多肽链的结合位点等问题。此外，是否这些寡聚糖就能解释精卵结合的物种特异性？对是否还有其他因素参与作用尚不了解。

已有大量的研究证明，哺乳动物精子顶体反应与其他细胞系统一样，也是由信息传递系统控制的。目前认为至少存在两类精子质膜受体（RZP）：一类是激活磷酸酯酶C（PLC）β1的Gi蛋白偶联受体；另一类是与PLCγ偶联的蛋白酪氨酸激酶（PTK）受体。有学者提出，ZP3与Gi蛋白偶联受体（第1类受体）结合可调节腺苷酸环化酶（AC）活性，提高细胞内cAMP水平，cAMP刺激蛋白激酶A（PKA），进而激发蛋白酪氨酸酸化作用。激活的PKA还作用于顶体外膜上电压依赖型Ca^{2+}通道，使顶体钙库释放出来。低密度释放的Ca^{2+}继而激活PLCγ及其偶联的PTK受体（第2受体），活化的PLC（γ和β1）再催化PIP2降解，并进一步使PKC转移定位到质膜并被激活，从而开放精子质膜上的电压依赖型Ca^{2+}通道，引起第2个Ca^{2+}高峰。此外，上述两类受体还可作用于Na^+通道，引起Na^+内流，并将胞内H^+泵出胞外，从而引起胞内pH升高，导致胞质碱性化。Ca^{2+}和pH的升高最终导致顶体反应。然而，在ZP诱导的顶体反应过程中，Ca^{2+}以何种方式和途径进入精子细胞以及精子鸟苷酸（G）结合调节蛋白（G-蛋白）的靶蛋白也是尚待解决的问题；G-蛋白直接作用于AC或PLC，还是通过其他蛋白质发生作用仍未阐明。ZP2作为精子第二受体与精子结合的化学本质和位点也有待研究。因此，哺乳动物精卵结合的分子生物学机制尚待揭示。

卵子的皮质颗粒内容物中有蛋白酶或糖苷酶，可分解ZP3而阻止多余精子与透明带的结合。此过程分两步：①ZP3上的初级精子受体所连接的寡聚糖在糖苷酶的作用下发生变化，ZP3被灭活，不能再识别和结合游离的精子。②ZP2上的次级精子受体在蛋白酶的作用下发生水解，ZP2被灭活，透明带的溶解性下降，即透明带发生硬化，阻止已结合甚至部分穿入透明带的精子穿过透明带。对于很多物种，受精会导致皮质颗粒释放进而作用于透明带，使其“硬化”，从而导致其结构发生变化，阻止多精入卵，但其硬化机制尚未阐明。对小鼠、猪及蟾蜍的研究表明，与此过程直接相关的变化只有蛋白酶水解ZP2的N末端，但这种变化如何引起透明带硬化仍不清楚。研究者提出一种假设，即透明带硬化过程是由ZP2和ZP3之间ZP1交联度的增加引起的。Yu sun等用“微机器人”探测技术证明，ZP硬化过程中，确实有ZP1交联的增加。至今为止，对于透明带反应和卵膜阻断的具体机制仍是一个谜。随着人们认识的不断深入，不仅能使我们进一步了解配子反应和受精的分子机制，而且可为日益扩大的辅助生殖技术提供广阔的应用前景。

参 考 文 献

El-Mestrah M, Castle PE, Kan FW, et al. 2002. Subcellular distribution of ZP1, ZP2 and ZP3 glycoproteins during folliculogenesis and demonstration of their topographical disposition within the zona matrix of mouse ovarian oocytes. Biol Reprod, 66(4): 866～876

Gadella BM, Tsai PS, Brewis IA, et al. 2008. Sperm head membrane reorganization during capacitation. Int J Dev Biol, 52(5～6): 473～480

Liu C, Litscher ES, Wassarman PM, et al. 1996. Targeted disruption of the mZP3 gene results in production of eggs lacking a zona pellucida and infertility in female mice. Proc Natl Acad Sci USA, 93(11): 5431～5436

Litscher ES, Williams Z, Wassarman PW. 2009. Zona pellucida glycoprotein ZP3 and fertilization in mammals. Mol Reprod Dev, 76(10): 933～941

Paterson M, Jennings ZA, Aitken RJ, et al. 2002. The contraceptive potential of ZP3 and ZP3 peptides in a primate model. J Reprod Immunol, 53(1～2): 99～107

Suarez SS. 2008. Control of hyperactivation in sperm. Hum Reprod Update, 14(6): 647～657

撰稿人：杨月琴　李继承

浙江大学

淋巴孔的生物学功能

The Biological Function of Lymphatic Stomata

淋巴孔（lymphatic stomata）是毛细淋巴管在浆膜间皮细胞间的微小开口，通过淋巴孔浆膜腔与淋巴管系直接相通。Von Recklinghausen 在 1863 年应用硝酸银染色首先在小鼠腹膜表面间皮细胞连接之间发现了小孔样结构，并将其命名为腹膜淋巴孔。淋巴孔分布广泛，除三大浆膜腔（腹膜腔、胸膜腔和心包腔）外，在脑膜及卵巢表面均有发现。淋巴孔具有主动物质吸收功能、免疫功能及调控功能，与浆膜腔积液的吸收、腹膜腔内感染性微生物的播散，以及肿瘤的转移和扩散等多种生理病理过程密切相关。

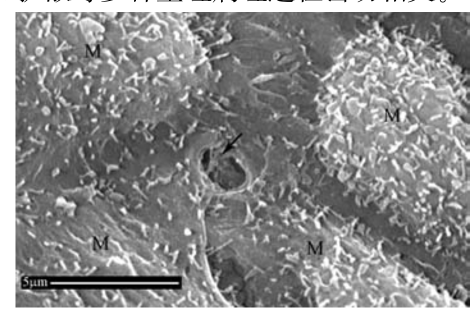


图 1　淋巴孔（箭）位于立方形间皮细胞（M）间，可见淋巴管内皮细胞丝状胞质横跨淋巴孔

在扫描电镜下观察可发现，浆膜表面覆盖有两种不同形态的间皮细胞：扁平形间皮细胞和立方形间皮细胞。淋巴孔一般位于立方形间皮细胞间，由胞体伸出的指状胞质突起与相邻细胞突起相互连接形成，呈圆形或椭圆形，有时可见间皮细胞伸出细丝状胞质桥联和微绒毛横跨淋巴孔（图 1）。应用 NaOH 消化技术，使部分间皮细胞脱落，暴露出间皮下网状的薄层纤维结缔组织，在无淋巴孔分布区域，结缔组织呈连续分布；在淋巴孔分布区域，结缔组织中可见许多筛斑（macula cribriformis），筛斑呈不规则分布，每个筛斑由许多圆形或椭圆形的筛孔组成，筛孔数量多于淋巴孔数量（图 2）。在透射电镜下观察发现，淋巴孔位于立方形间皮细胞间，可见淋巴管内皮细胞胞质突起伸入结缔组织。借助淋巴孔，浆膜腔与间皮下毛细淋巴管系直接沟通，形成浆膜腔物质引流的直接通路(图 3)。

间皮细胞来源于胚胎中胚层，受精后 8～18 天开始分化。笔者实验室的研究发现，人膈腹膜淋巴孔最早发生于胚胎 20～32 周。小鼠膈腹膜淋巴孔的形态学发育过程是：在胚胎期，膈腹膜表面覆盖一单层间皮细胞，细胞之间靠紧密连接附着在基底膜上，细胞呈扁平状，只有少量微绒毛，基底膜较疏松，其下已经有淋巴管出现；出生后，淋巴管内皮细胞的胞质突起逐渐伸入基底膜结缔组织中，

并穿透基底膜结缔组织与间皮细胞接触，间皮细胞回缩，向立方形间皮细胞转化，淋巴孔形成。但是笔者的研究显示在小鼠胚胎 15 天时，膈腹膜表面扁平形间皮细胞间就已经出现了早期的腹膜淋巴孔，但是不具有物质吸收功能。目前，对淋巴孔发生发育的研究仅局限于其形态学的发育过程，淋巴管内皮细胞胞质突起如何向结缔组织伸入，扁平形间皮细胞如何向立方形间皮细胞转化，淋巴孔发生发育的分子调控机制如何，都尚未有研究报道。

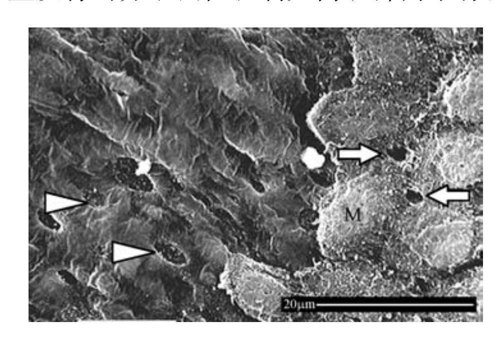


图 2 NaOH 消化去除部分间皮细胞（M），暴露出间皮下结缔组织，可在淋巴孔（箭）分布区域发现筛孔（箭头）

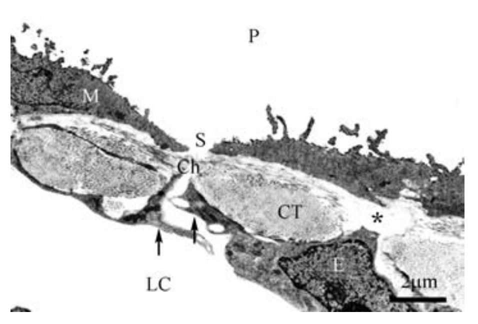


图 3 透射电镜显示经淋巴孔（S）浆膜腔（P）与间皮（M）下毛细淋巴管系（LC）直接沟通

淋巴孔的主要功能是使浆膜腔与脉管系沟通，形成两者间的直接通道，这个通道无论在生理和病理上都具有重要意义。同时淋巴孔的吸收受到多种因素的调控。组成淋巴孔的间皮细胞、淋巴管内皮细胞及结缔组织成纤维细胞上常发出一些胞质突起伸入淋巴孔下小管内，形成活动的瓣膜状结构，从而调节淋巴孔的吸收，保证淋巴吸收从浆膜腔向淋巴管的单向流动。膈腹膜淋巴孔的开合与呼吸运动有关，吸气时膈肌收缩，淋巴孔开放数量减少；呼气时膈肌松弛，淋巴孔开放数量增多。腹内压的变化也可影响淋巴孔的开放，腹内压增加时淋巴孔开放数量增多。血管内皮生长因子（VEGF）和血管紧张素Ⅱ（AngⅡ）能促进蛙心包淋巴孔的开放，具有明显的调控淋巴孔的功能。也有研究表明性激素也可调节淋巴孔的开放及吸收功能。NO 是淋巴孔调控研究的关键因子，它可以升高 cGMP 水平，降低腹膜间皮细胞内游离［Ca^{2+}］，通过 NO-cGMP-Ca^{2+} 通路调控淋巴孔的开放和淋巴吸收。但是，所有对淋巴孔分子调控的研究都只停留在初级阶段，细胞因子通过什么方式调控淋巴孔的开合，淋巴孔发育过程中哪些因子起调控作用，分子调控的细胞内信号转导具体通路有哪些，作用于细胞的什么部位，有待进一步探讨。

浆膜腔内的液体、颗粒物质、感染性微生物及肿瘤细胞都可通过淋巴孔被淋巴系统吸收，进入血管。Tsilibary 提出淋巴引流单位（lymphatic drainage unit）

的概念，从淋巴孔到淋巴陷窝有三层结构：①淋巴管内皮细胞；②腹膜间皮细胞；③两者之间的薄层结缔组织。作者指出在腹水转归过程中，淋巴引流单位起到了重要作用。并且淋巴管系中的巨噬细胞可经淋巴孔进入浆膜腔，在浆膜表面聚集形成乳斑结构（milky spot），亦可从腹膜腔经腹膜淋巴孔进入淋巴管系。我们认为，巨噬细胞能经淋巴孔游走于淋巴管和浆膜腔，在浆膜腔炎症的局限化、阻止或延缓肿瘤细胞转移等过程中发挥重要作用。但是，在患病（积液、肿瘤）时，淋巴孔的吸收功能具体起多大的作用，能否应用调节淋巴孔开放药物治疗疾病，有待进一步研究。

总之，淋巴孔是在人体浆膜上普遍存在的，它沟通了人体的浆膜腔与脉管系统。在病理生理中，淋巴孔受多种因素的调控，揭示其机制，对治疗涉及腹膜腔、胸膜腔和心包腔等的临床疾病有重要意义。

参考文献

Funatsu K, Nishihara H, Nozaki Y, et al. 1998. A case of a solitary metastatic diaphragmatic tumor-relation to the peritoneal stomata of the diaphragm. Radiat Med, 16(5): 363～365

Leak LV, Rahil K. 1978. Permeability of the diaphragmatic mesothelium: the ultrastructural basis for "stomata". Am J Anat, 151(4): 557～593

Li H, Li J. 2003. Development of the peritoneal lymphatic stomata and lymphatic vessels of the diaphragm in mice. Ann Anat, 185(5): 411～418

Li J, Lu Z, Wu N, et al. 1996. A scanning electron microscopy and computer image processing morphometric study of the pharmacological regulation of patency of the peritoneal stomata. Ann Anat, 178(5): 443～447

Li M, Zhou TH, Gao Y, et al. 2007. Ultrastructure and estrogen regulation of the lymphatic stomata of ovarian bursa in mice. Anat Rec (Hoboken), 290(10): 1195～1202

Li YY, Li JC. 2008. Cell signal transduction mechanism for nitric oxide regulating lymphatic stomata and its draining capability. Anat Rec (Hoboken), 291(2): 216～223

Shimotsuma M, Takahashi T, Kawata M, et al. 1991. Cellular subsets of the milky spots in the human greater omentum. Cell Tissue Res, 264(3): 599～601

Toshio Nakatai, Shigenori Tanaka, Shigeki Mizukami. 1997. Peritoneal lymphatic stoma of the diaphragm in the mouse: process of their formation. Anat Rec, 248: 121～128

Tsilibary EC, Wissig SL. 1987. Light and electron microscope observations of the lymphatic drainage units of the peritoneal cavity of rodents. Am J Anat, 180(2): 195～207

Von Recklinghausen F. 1863. Zur Fettresorption. Virchows Arch, 26: 172～208

撰稿人：王自彬　李继承

浙江大学

恶性肿瘤转录调控网络中的主要控制因素

The Master Control Factors for Transcriptional Regulatory Network of Malignant Tumors

1. 背景

恶性肿瘤是一种多基因病，称为复杂性状病或多因素病，是由一个或多个基因与一种或数种环境因素共同作用产生的疾病，不遵守孟德尔规律。多基因复杂性疾病的表型是由于多个基因发生改变的结果，涉及多种信号转导途径。肿瘤的基因调控网络是极其复杂的，由多种不同的转录调节通路或生化反应过程构成了一个复杂有序的调控体系。目前，基因调控网络的研究集中在蛋白质与蛋白质、蛋白质与核酸相互作用的极其复杂的机制。在恶性肿瘤转录调控网络的研究中是否存在着类似于单基因病的决定性调控因素呢？单基因病是由染色体上单一基因的一个或两个等位基因突变所致的疾病。单基因病因素单一，基因型-表型关系清晰。Rb 基因纯合性缺失引起的视网膜母细胞瘤（retinoblastoma）就是一种常见的单基因肿瘤。Rb 基因是人类发现的第 1 个肿瘤抑制基因。视网膜母细胞瘤可发现 Rb 基因突变和 Rb 蛋白表达缺失或降低。Rb 蛋白有多个结构域，可和多种蛋白质结合，如病毒癌基因蛋白（SV40 大 T 抗原、腺病毒 E1A 蛋白、乳头状病毒 E7 蛋白）、E2F 蛋白。Rb 蛋白与 E7 蛋白结合而失活，并通过与 E2F 蛋白结合来抑制多种与细胞周期进程相关基因的转录活性，从而抑制细胞的恶变过程。在对于多基因肿瘤的研究中，发现大部分恶性肿瘤是若干微效基因累积效应的结果。p53 基因是迄今发现的与人类肿瘤相关性最高的基因。p53 基因与超过 50% 的人类肿瘤有关，包括肝癌、乳腺癌、膀胱癌、胃癌、结肠癌、前列腺癌、软组织肉瘤、卵巢癌、脑瘤、淋巴细胞肿瘤、食管癌、肺癌、成骨肉瘤等。但是在不同部位的肿瘤 p53 突变位点并不相同。BRCA1 被认为是乳腺癌的易感基因，40% ～50% 的乳腺癌患者存在着 BRCA1 的突变。BRCA1 相关的蛋白质相互作用调控网络在乳腺癌的发生发展中起到了关键的作用（图 1）。

2. 科学意义

恶性肿瘤的发病率逐年上升，死亡率超过心脏病，排在首位，严重威胁人们的健康。恶性肿瘤是一种多基因病，是多个基因发生改变的结果，涉及多种信号转导途径。如何在复杂的调控网络中找到主要的控制因素，对于恶性肿瘤的诊

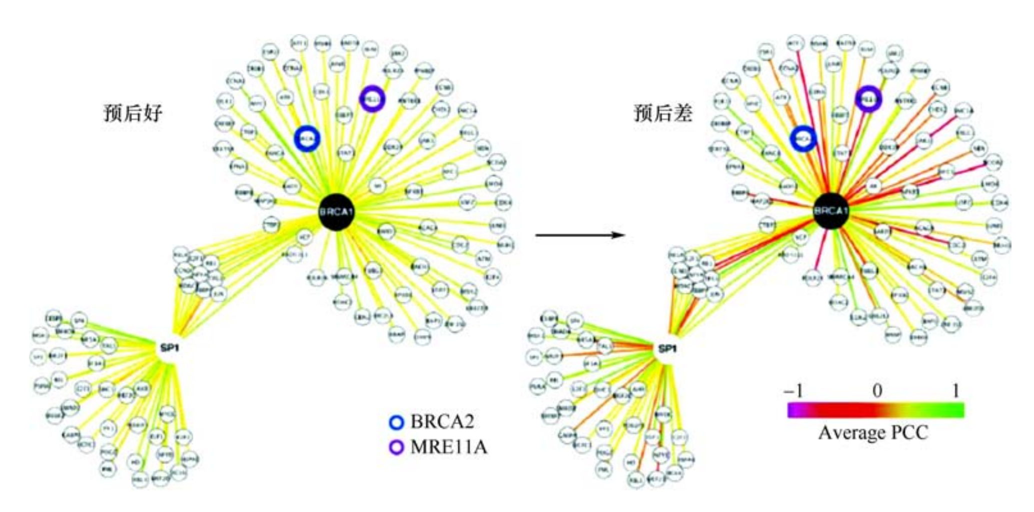


图1　乳腺癌不同预后患者BRCA1的相互作用蛋白质网络图

BRCA1、SP1及相互作用蛋白对于乳腺癌患者的预后评价具有重要的意义（绿色线条代表紧密联系，相互调控；红色代表紧密联系消失，调控作用减弱）［Taylor IW，et al. 2009. Nat Biotechnol，（27）：199～204］

断、判断预后和治疗具有重要的作用。国际上首个基因治疗的药物今又生，即以p53为治疗靶点。目前发现，表皮生长因子受体（EGFR）在结/直肠癌、头颈部鳞癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌等很多肿瘤细胞的生长、侵袭转移等方面起了极重要的作用，其过度表达与预后差、转移快、生存时间短等相关。临床通过抑制EGFR酪氨酸激酶的活性，在多种肿瘤中取得了很好的治疗效果，那么EGFR介导的酪氨酸激酶活性的增高是否是这些肿瘤的关键的分子改变？破解恶性肿瘤转录调控网络中的主要控制因素这个科学难题，对于这些肿瘤的诊断和治疗具有指导作用。

3. 最新进展

高通量的组学方法对于研究转录调控网络具有重要的意义。在研究基因功能的过程中出现了蛋白质组学（研究细胞内基因组表达产生的所有蛋白质）、转录组学（研究细胞内基因组转录产生的所有转录物）、代谢组学（在某一时刻细胞内所有代谢物的集合）等。实验室的分子生物学方法是研究基因间相互作用网络的直接手段，但是对于生物体这一复杂的系统，如何在系统水平上研究基因调控是目前的研究重点和难点。随着基因芯片等基因表达谱技术的发展和数据库的建立，应用交互信息理论方法来系统地分析恶性肿瘤的转录组数据，探索转录调控网络，可能发现主控因素。有研究者在恶性程度比较高的胶质母细胞瘤中发现其表达“间质”基因。应用生物信息学方法，研究人员已将转录因子STAT3和C/EBP-β确定为这种间质转化的主调控因子。这种识别调控肿瘤恶性主要调控因

子的系统生物学方法对于临床的治疗和判断预后具有指导意义。

4. 主要难点

如何寻找并研究多基因病的关键基因以及相关的转录调控是目前的研究难点。基因表达存在组织特异性、细胞周期特异性等，这些特异性都是由细胞内复杂而有序的调控机制实现的。基因表达调控机制的研究对于寻找关键作用的基因具有非常重要的理论和应用价值，其研究目的是要回答以下问题：在特定的细胞状态下，有哪些基因发生了表达？它们是通过何种方式被调控的？这些基因的产物对细胞的生理活动会产生什么影响？在这种复杂的调控体系中，是否存在对整个调控体系起到关键作用的主控因素？这种主控因素可能是一种转录调节通路当中的关键环节、关键因子，或许是某一生化反应过程中的关键环节，或许是某一种基因结构、基因产物的改变，或许是有某种或某群基因在整个调控网络中起到主效基因的作用（图 2）。这是肿瘤发生机制和癌变原理研究领域中的关键科学问题，也是科学家面临的重要难题。基因表达调控的研究是后基因组时代的核心内容，是系统生物学的主要研究内容。要构建基因表达调控网络，需要深入系统地对细胞生物大分子及其相关物质全面研究，得到大量数据。为了满足大规模、高通量的分析需求，对于高通量的研究方法和构建庞大网络的网络理论和计算性能也提出了挑战。

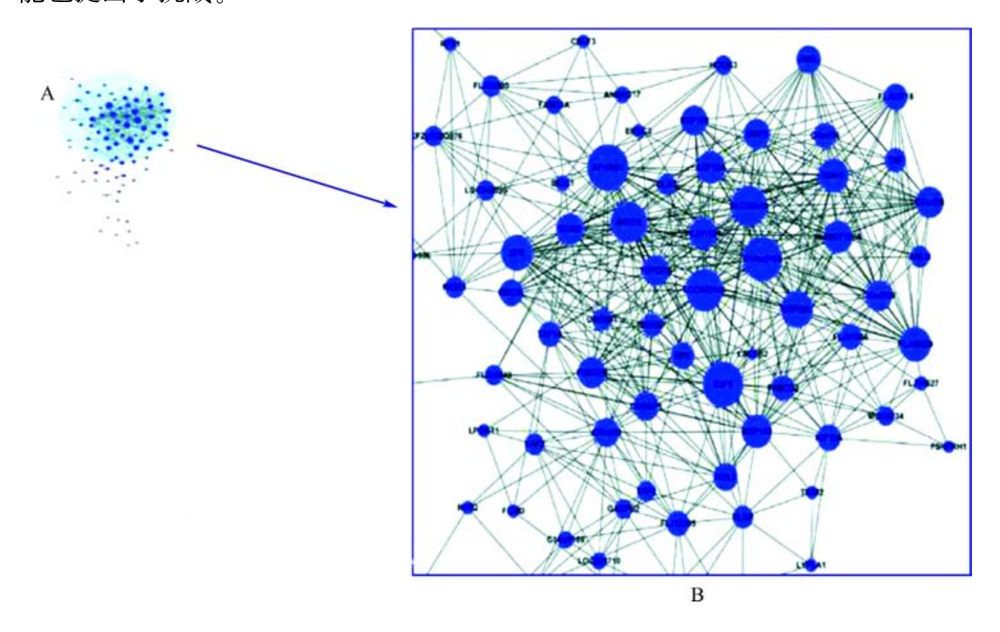


图 2　结肠癌的基因调控网络

A．显示的是调控网络中的核心

参考文献

李夏雨. 2010. 不同阶段结直肠癌动态转录组与表达调控网络构建的生物信息学分析. 中国博士学位论文

Carro MS, Lim WK, Alvarez MJ, et al. 2010. The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. Nature, 463(7279):318～325

Hall JM, Lee MK, Newman B, et al. 1990. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. Science, 250: 1684～1689

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al. 1991. p53 mutations in human cancers. Science, 253(5015): 49～53

Korenjak M, Brehm A. 2005. E2F-Rb complexes regulating transcription of genes important for differentiation and development. Curr Opin Genet Dev, 15(5): 520～527

Murphree AL, Benedict WF. 1984. Retinoblastoma: clues to human oncogenesis. Science, 223(4640): 1028～1033

Taylor IW, Linding R, Warde-Farley D, et al. 2009. Dynamic modularity in protein interaction networks predicts breast cancer outcome. Nat Biotechnol, (27): 199～204

Zhang H, Berezov A, Wang Q, et al. 2007. ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. J Clin Invest. 117(8): 2051～2058

撰稿人：向娟娟　李桂源

中南大学

宿主细胞中是否存在致瘤病毒潜伏与裂解性复制的启动与转换“开关”

What Is the “Switch” Triggering the Transition from Latent to Lytic Infection of Tumor Viruses in Host Cell

1. 背景

大约15%的人类肿瘤与病毒的感染有关。例如，EB病毒（EBV）参与Burkitt淋巴瘤和鼻咽癌的发生；人乳头状瘤病毒（HPV）可引起宫颈癌；而乙型肝炎病毒（HBV）和丙型肝炎病毒（HCV）则是肝癌的重要元凶。这些肿瘤病毒能在人体内建立长期的持续性感染，其感染性质是其区别于其他所有致瘤因素的重要特征。肿瘤病毒在建立潜伏感染的细胞内，通常不产生完整的病毒子，只表达少数几种病毒产物。不同的肿瘤病毒在建立潜伏感染后的生活周期有所差异。由于病毒生存和再感染的需要，在某些细胞内可能出现病毒复制，病毒的大量复制会导致细胞裂解，例如EBV，在发生这种裂解性复制的时候，核酸复制、大量的病毒蛋白表达、病毒包装，具有感染性的病毒子释放到细胞外。

如图1所示，EBV感染B细胞后在体内并存两种感染模式。EBV潜伏感染静止的B细胞，有限的基因表达使之能逃避T细胞的免疫监视，病毒基因组则随着细胞的复制而复制。在凋亡的B细胞和浆细胞中，EBV表现为裂解性感染。在鼻咽癌细胞中，EBV也主要为潜伏感染，表达核抗原EBNA1、潜伏膜蛋白1和2（LMP1和LMP2）等。

2. 科学意义

在肿瘤的发生发展中，潜伏感染状态的EBV可能自发进入裂解性复制期，此时，机体产生较高的抗EBV裂解性抗原如壳抗原（VCA）的抗体水平，并与病程进展及预后差密切相关。在EBV稳定潜伏感染的细胞的裸鼠成瘤模型中也证实，在个别细胞中成熟病毒子可自发产生。这两种感染模式对病毒生存并在体内发挥致瘤作用都很重要，两种模式的并存尤其是从潜伏感染转换为裂解性感染是病毒与细胞相互作用的结果。在肿瘤细胞中，这两者的转换很可能与肿瘤发生过程中某种（些）生化产物的活化有关。

潜伏与裂解感染模式的启动与转换是一个令人感兴趣的课题，但是宿主细胞中是否存在与肿瘤发生相关的细胞蛋白直接启动这种转换仍然是个科学难题。该难题的解决将为EBV在肿瘤发生中与宿主细胞的相互作用提供重要的依据，也

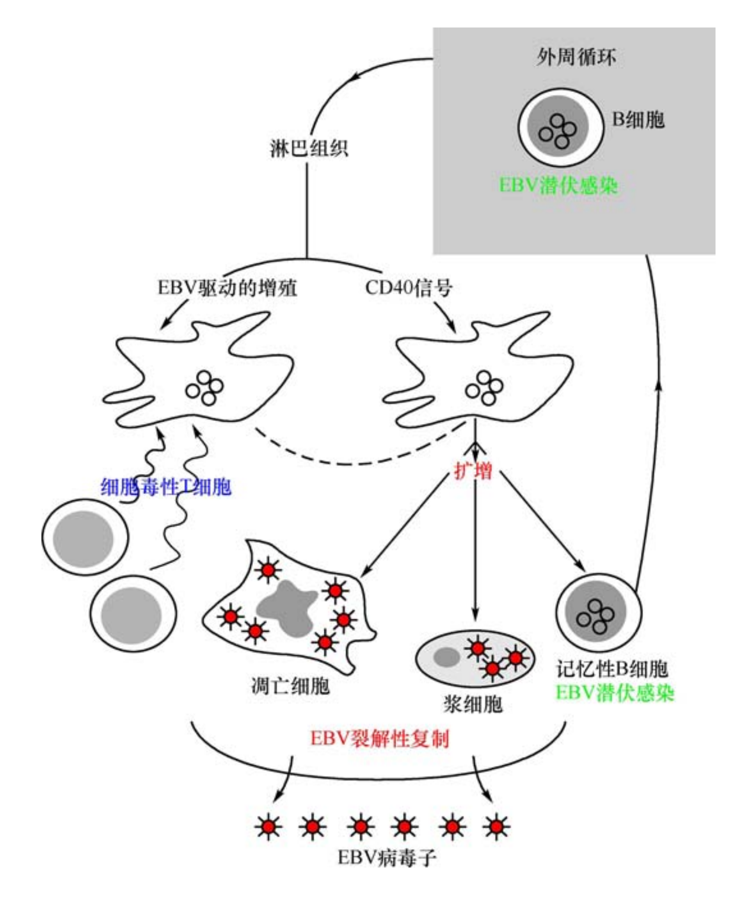


图1　EBV在体内持续感染中的两种感染模式

为EBV的病因学提供科学基础，为针对病毒的肿瘤治疗提供新的靶标。

3. 最新进展

在体外，某些诱导剂如佛波脂（TPA）也可诱导EBV潜伏感染的细胞产生有感染性的病毒子。在此过程中，首先是EBV的早期基因BZLF1等经诱导而表达Z蛋白。在EBV潜伏感染的细胞模型中，直接使用BZLF1表达质粒转染可以使感染性EBV产生。

研究表明，EBV-BZLF1基因启动子的甲基化会影响Z的表达，B细胞向浆细胞终端分化过程中起重要作用的X盒连接蛋白（XBP-1）与蛋白激酶D（PKD）的连接能有效激活Z启动子。在特定的细胞中，细胞蛋白ZEB1通过直接结合于Z的启动子抑制BZLF1的表达。可见，BZLF1的表达受到激活和抑制两方面的调控。这些调控因素与肿瘤的发生有什么关系？其机制需要进一步阐明。

4. 拟解决的方法和主要难点

深入的研究依赖于现代分子生物学技术、肿瘤学技术及病毒感染的细胞和致瘤模型的建立。以 EBV 为例，根据已报道的研究结果，BZLF1 和 BRLF1（主要是 BZLF1）是 EBV 两种感染期转换的关键点，而与它们启动子结合的转录因子及启动子的表观修饰是调控这种转换的重要因素。应用 EBV 潜伏感染（永生化）的淋巴细胞或者上皮细胞模型，使用致癌剂如 TPA 诱导，然后应用芯片检测，分析诱导前后细胞中转录因子及基因表达谱的改变，找出差异的转录因子和差异基因。染色质免疫共沉淀-芯片（ChIP-chip）技术，可用以分析与 BZLF1 DNA 启动子结合和相互作用的转录因子及其他蛋白质。使用荧光素酶报告基因等技术观察特定转录因子与 BZLF1 和 BRLF1 的结合。要获得 BZLF1 的表观修饰和转录因子等的高分辨率图谱，与 chip 结合的新一代高通量的测序技术（ChIP-seq）则是更先进的技术。还需要进一步分析与 BZLF1 结合的转录因子或者蛋白质是否为肿瘤发生发展过程中被活化的重要产物，研究它们的活化与 EBV 相关肿瘤发生的关系，确定其是否为肿瘤发生发展的重要因素。

在这个难题的研究中，最好能使用特定的致瘤模型进行验证。从 EBV 潜伏感染的肿瘤细胞群中分离出“自发”进入裂解复制期的细胞，用它们与潜伏感染的细胞进行比较研究。这是比较理想的设计，但是难度很大。另外，根据 EBV 等的感染特点，建立全部细胞中的 EBV“自发”进入裂解复制期的细胞模型的可能性很小。然而，在潜伏感染的细胞模型中进行诱导，使部分细胞进入裂解期，通过一定的标记和流式细胞术，分选出有和没有 EBV 成熟病毒产生的细胞，然后进行比较研究，也是可行的。

参 考 文 献

Bhende PM，Dickerson SJ，Sun X，et al. 2007. X-box-binding protein 1 activates lytic Epstein-Barr virus gene expression in combination with protein kinase D. J Virol，81：7363～7370

Carrillo-Infante C，Abbadessa G，Bagella L，et al. 2007. Viral infections as a cause of cancer. Int J Oncol，30：1521～1528

Dickerson SJ，Xing Y，Robinson AR，et al. 2009. Methylation-dependent binding of the Epstein-Barr virus BZLF1 protein to viral promoters. PLoS Pathog，5(3)：e1000356

Ellis AL，Wang Z，Yu X，et al. 2010. Either ZEB1 or ZEB2/SIP1 can play a central role in regulating the Epstein-Barr Virus latent-lytic switch in a cell type-specific manner. J Virol，84(12)：6139～6152

Lu JH，Tang YL，Yu HB，et al. 2010. Epstein-Barr virus infection facilitates the malignant potential of immortalized human epithelial cells：from latent genome to viral production and maintenance. Lab Invest，90：196～209

Park PJ. 2009. ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. Nat Rev Genet, 10(10):669～680

Tang Y, Lu J, Wu M, et al. 2007. Lytic replication and inductive production of recombinant Epstein-Barr virus visualized. Prog Biochem Biophys, 34(4):418～424

撰稿人:卢建红　李桂源
中南大学

肿瘤干细胞的来源

The Origin of the Cancer Stem Cell

肿瘤干细胞是存在于肿瘤组织或肿瘤细胞系中数量很少的细胞亚群，少量肿瘤干细胞就可以在免疫缺陷小鼠形成肿瘤。肿瘤干细胞和干细胞有相似性，具有自我更新和分化的特征。肿瘤干细胞通过自我更新，使肿瘤干细胞的成瘤性得以保持。通过分化形成肿瘤组织中所有不同表型的非肿瘤干细胞，是肿瘤异质性的基础。

近年来，肿瘤干细胞来源说受到关注，因为在实体瘤肿瘤中分离出了肿瘤干细胞。肿瘤干细胞研究热形成的背景与近年对干细胞的关注是密不可分的，因为胚胎干细胞和成体干细胞可能用于疾病治疗，有巨大的潜在应用价值。近年的干细胞热首先兴起于“多莉”羊的克隆，其后又分离和克隆了人的胚胎干细胞，再后来进一步发现了存在于各种组织中的成体干细胞。

肿瘤干细胞的发现，解释了肿瘤是如何形成的，但并没有回答肿瘤形成的终极细胞来源，也就是肿瘤干细胞究竟来源于什么细胞，更没有回答肿瘤干细胞形成的机制。关于肿瘤形成的机制，首推多步多机制学说。该理论认为，细胞癌变过程分为三个阶段：①永生化阶段（immortalization）；②促进阶段（promotion）；③推进阶段（progression）。该理论认为，一个正常细胞转化成具有转移能力的癌细胞涉及多个基因突变，包括细胞癌基因、癌抑制基因，以及与细胞表型有关的其他基因，如转移相关基因等。这些基因的突变不会同时出现，而是分步发生，细胞分步获得基因突变导致出现新的细胞性状，逐步积累，完成肿瘤的发生和演进过程。而多机制是指在这三个阶段中，细胞的变化涉及基因的突变和表观遗传修饰的变化等机制。基因突变可使肿瘤抑制基因丧失抑癌功能，也可使原癌基因激活，而表观遗传修饰的变化可以对肿瘤抑制基因或原癌基因的表达进行调节，产生类似基因突变的效果。但是这一理论并没有指出癌细胞究竟是来源于何种细胞，是肿瘤干细胞、祖细胞，还是终末分化的体细胞？实际上，对于癌细胞的来源，很早就有两种互不排斥的学说：一是认为肿瘤来自于干细胞，但这一假说许多年来仅限于解释血液系统的肿瘤；二是来自于终末分化细胞，终末分化细胞通过去分化形成肿瘤细胞。

正常干细胞转化为肿瘤干细胞的经典证据是 1967 年 Leroy Stevens 的实验。Leroy Stevens 将来自于小鼠胚胎生殖脊的干细胞移植到小鼠睾丸后，干细胞形

成了畸胎瘤。这一实验说明，正常干细胞在异常的环境内，可以形成肿瘤。近年的研究证明，正常组织中的确存在干细胞。间充质细胞是一类成体干细胞，研究表明，间充质干细胞细胞在体外长期培养后可自动形成肿瘤，在间充质细胞表达端粒酶也可促进成体干细胞间充质细胞的恶性变。Youssef 等的研究发现，激活小鼠表皮干细胞的 Hedgehog 信号转导途径，表皮干细胞并不能形成皮肤基底细胞癌，但表皮祖细胞却可形成皮肤基底细胞癌。这说明在某种情形下，干细胞也并一定是肿瘤干细胞的来源，而且不同的肿瘤，不同的致癌机制，其肿瘤干细胞的来源也可能有差别。

祖细胞由正常干细胞分化而来，但祖细胞和干细胞的区别是祖细胞失去了自我更新的能力。因此，祖细胞要转化为肿瘤干细胞需要激活与自我更新有关的基因，重新获得自我更新能力。有研究证明，皮肤小细胞癌由祖细胞转化而来。Park 等的研究发现，在斑马鱼胰腺祖细胞表达 KRAS，可阻滞胰腺祖细胞的分化，使胰腺祖细胞数目增多，最终形成胰腺癌。

终末分化细胞可通过去分化转化为肿瘤干细胞，在去分化的过程中，终末分化获得肿瘤干细胞的自我更新能力，并失去正常的分化特征。Bachoo 等的研究表明，终末分化的星形胶质细胞如果失活 Ink4a/Arf，并同时激活上皮细胞生长因子受体，星形胶质细胞可以形成胶质细胞瘤。Krivtsov 等的研究表明，白血病肿瘤干细胞也可由祖细胞转化而来。

由于有各种各样的实验支持正常干细胞、祖细胞和终末分化细胞均可形成肿瘤，并且肿瘤是由肿瘤干细胞分化形成的，因此可以推测，肿瘤干细胞可以通过上述三类细胞而来。但存在的问题是：①在形成某一肿瘤的过程中，这三类细胞是否可以同时成为某种肿瘤的来源；②不同组织来源的肿瘤和不同的致癌原因所致的肿瘤，其肿瘤干细胞的来源有无细胞特异性，即瘤干细胞是否来源于特定的细胞类型；③尚没有在单个细胞水平证实上述来源的瘤干细胞，也就时说，肿瘤干细胞来源的证据链还不完整。上述提及的各种支持肿瘤干细胞来源的实验，都对正常干细胞、祖细胞和终末分化细胞进行了一定处理，使其形成肿瘤，进而在理论上推导肿瘤干细胞的来源，但并无直接实验证明上述三类细胞直接转化为肿瘤干细胞。对上述三类细胞转化肿瘤干细胞的中间机制也了解得很少。

证明肿瘤干细胞来源的过程就是证明某种细胞如何转化为肿瘤干细胞的过程，这是肿瘤生物学研究的核心问题。研究这一问题对肿瘤的预防和治疗都有非常重要的意义，可为肿瘤的预防和治疗找到新的靶点。

未来对肿瘤干细胞的研究应在单细胞水平直接证明肿瘤干细胞的来源和机制，同时要针对不同组织类型的肿瘤、不同的致癌原因，找出相应的肿瘤干细胞来源（图 1）。

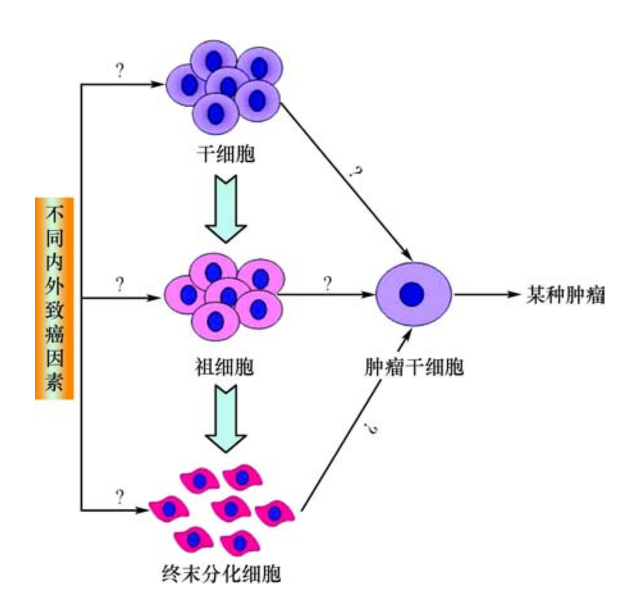


图 1　肿瘤干细胞的来源

肿瘤干细胞可能是在不同致癌因素作用下，由干细胞、祖细胞或终末分化细胞基因突变转化而来的

参考文献

Al-Hajj M , Wicha MS , Benito-Hernandez A ,et al. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci USA , 100 : 3983～3988

Bachoo RM , Maher EA , Ligon KL ,et al. 2002. Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf : convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. Cancer Cell , 1 : 269～277

Krivtsov AV , Twomey D , Feng Z. 2006. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. Nature ,442 : 818～822

Miura M , Miura Y , Padilla-Nash HM ,et al. 2006. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. Stem Cells , 24 : 1095～1103

Nowell PC. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. Science ,194 : 23～28

Park SW , Davison JM , Rhee J ,et al. 2008. Oncogenic KRAS induces progenitor cell expansion and malignant transformation in zebrafish exocrine pancreas. Gastroenterology ,134 : 2080～2090

Pitot HC , Dragan YP. 1991. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. FASEB J , 5 : 2280～2286

Sell S. 1993. Cellular origin of cancer : dedifferentiation or stem cell maturation arrest ? Environ Health Perspect , 101(Suppl 5) : 15～26

Till JE. 1982. Stem cells in differentiation and neoplasia. J Cell Physiol Suppl, 1: 3～11
Youssef KK, Van Keymeulen A, Lapouge G, et al. 2010. Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma. Nat Cell Biol, 12: 299～305

撰稿人：熊静波
南方医科大学

肿瘤演进过程中转录组和蛋白质组的时间系列变化规律

The Rules of Dynamic Transcriptome and Proteome in Different Time Series of Cancer Progression

1. 背景及科学意义

恶性肿瘤的发生发展是一个多步骤多因素参与的复杂过程，是许多微效累加基因和环境因素共同作用的结果，其性状变异呈现连续的数量级差改变，而不遵循经典的孟德尔遗传规律。同时恶性肿瘤的发生发展也是一个连续过程，在演进的每一个时间系列或者每一个不同演进阶段，肿瘤细胞的转录组和蛋白质组可能会产生较大的变化，而这种变化又将对肿瘤的进一步演进起到推波助澜的作用。

在既往的肿瘤研究中，人们主要进行的是肿瘤患者与健康人群的对比，或是针对肿瘤孤立的阶段、孤立的时空或状态进行比较研究。这样的研究结果往往不能反映肿瘤从始动阶段到演进各阶段连续变化的过程。而肿瘤发生发展过程中转录组和蛋白质组的连续变化是客观存在的，且这种变化会影响不同临床阶段肿瘤患者对治疗的反应性和敏感性，产生不同的治疗效果。因此如何在时间序列上抓住肿瘤演进不同阶段转录组、蛋白质组的动态变化规律，阐明恶性肿瘤发生发展过程中的分子细胞学机制，建立正常组织向肿瘤组织转变过程及肿瘤演进过程中的复杂基因调控网络，筛选可靠的肿瘤分子标志物群等长期以来是肿瘤研究领域的关键，亦是肿瘤研究领域的重大难题。

2. 最新进展

随着各种高通量技术的发展和应用，世界范围内不同的研究团体所产出的基因表达谱、蛋白质组、转录因子活性谱、miRNA 表达谱及蛋白质的磷酸化、乙酰化、糖基化和甲基化修饰谱等数据库均在持续增长。同时利用高内涵筛选技术（HCS）和组织芯片技术有可能在细胞水平和组织水平对所筛选出的大量感兴趣的基因进行大规模的验证。2006 年，Jason Moffat 针对 1028 个人类基因多个靶点设计了 5000 条 shRNA，利用慢病毒 RNA 干扰和高内涵筛选技术观察这 1028 个基因对细胞有丝分裂和增殖的影响，最后获得了 100 多个目的基因。

利用这些数据库的结果和各种高通量的技术，人们开始尝试利用整合组学的思路来对肿瘤的始动及不同演进阶段的动态变化进行综合分析。如 Ian W Taylor 等对约 350 名乳腺癌患者乳房肿瘤组织中的蛋白质相互作用网络进行分析，总共

研究了 8000 种蛋白质的 30 000 种作用方式，发现大约 250 种蛋白质的动态变化网络对预测病情发展至关重要。通过观测这些蛋白质的相互作用，对乳腺癌患者未来病情走势预测的准确率可以达到 82%。李桂源课题组运用基因组学、转录组学、蛋白质组学的高通量技术对鼻咽癌不同分化阶段、不同组织类型和不同临床分期的鼻咽癌标本进行了大规模筛选，并结合国际上的有关进展构建了由 139 个基因组成的鼻咽癌不同发病阶段的分子靶标系统，为后续的鼻咽癌分子分型奠定了基础（图 1）。

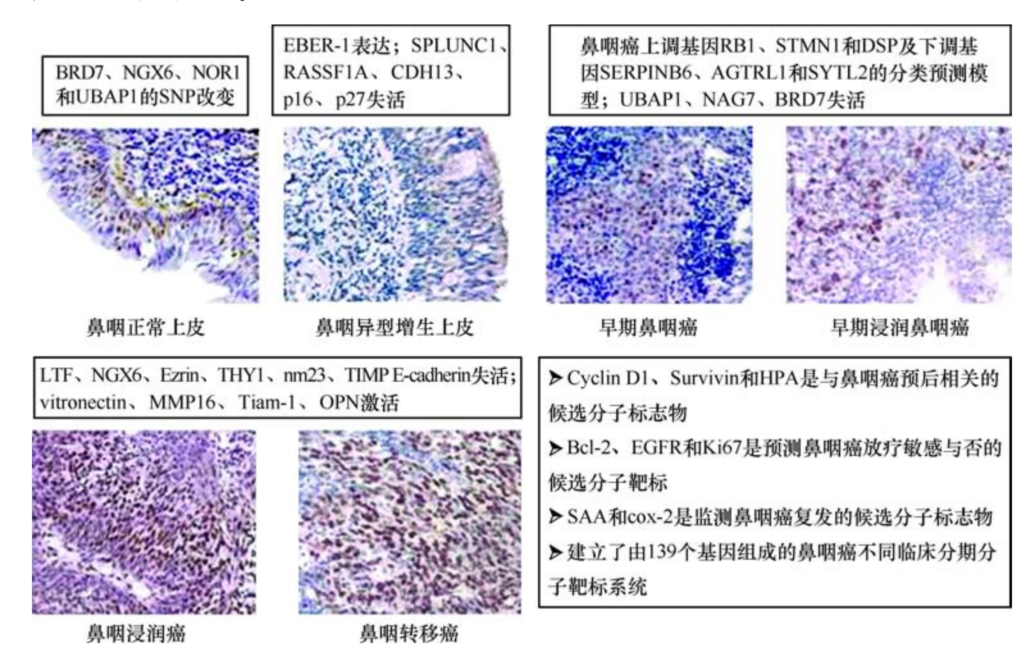


图 1　鼻咽癌发病不同阶段候选分子标志物模式图

3. 主要难点

虽然研究者们已经开始有益的尝试，但是针对肿瘤始动阶段和不同演进阶段，寻找转录组和蛋白质组的动态表达规律，筛选可靠的肿瘤分子标志物群，构建具有临床指导意义的肿瘤分子分型模型并不是一件简单的工作，还存在一系列亟须解决的科学难题。

时间序列是一种重要的高维数据类型，它是由客观对象的某个物理量在不同时间点的采样值按照时间先后次序排列而组成的序列，具有高维性、复杂性、动态性、高噪声特性以及容易达到大规模的特性。在生物医学的肿瘤研究领域，虽然不同数据库的数据量在不断增长，但是每个实验往往只包含有限的几个时间点，导致数据集往往只是由关于大量基因的少数相关的时间点所构成，这就给调控网络的推导带来了困难。而不同组数据间实验条件的不同又导致无法对时延、

时序等进行比较。因此，针对肿瘤发生、发展的不同演进阶段，设计多个时间进行数据采集和内在动态变化规律的归纳将是研究的关键之一。

基因表达、蛋白质翻译及翻译后修饰、表观遗传学调控等构成了错综复杂的基因调控网络。仅仅通过单个数据网络的分析，已远远不能完成对复杂生命现象的了解。因此，如何在进一步发掘单方面数据的基础上，整合多个不同层次的分析结果，分析内在的因果关系，构建高效、可信的基因调节网络，从而揭示肿瘤发生、发展的本质是一大科学难题。

不同时间序列和不同分子层面的研究提供了海量的数据，构成了庞大的基因调节网络。小规模网络分析由于可利用已知的生物实验作为验证，因此有关局部基因调节网络的研究比较普遍。而大尺度的网络构建的有效生物学验证手段虽有所突破，但仍相对研究困难。如何对所得到的肿瘤不同演进阶段的动态变化规律和内在的调控网络进行大规模生物实验的筛选与验证亦是解决问题的关键难点之一 。

参 考 文 献

李桂源，刘华英，周鸣，等. 2006. 鼻咽癌癌变的分子机理. 生物化学与生物物理进展，33(10)：922～931

刘万霖，李栋，朱云平，等. 2007. 基于微阵列数据构建基因调控网络. 遗传，29(12)：1434～1442

张文玲，周艳宏，肖岚，等. 2008. 鼻咽癌分子标志物研究. 生物化学与生物物理进展，35(1)：7～13

Androulakis LP，Yang E，Almon RR. 2007. Analysis of time-series gene expression data：methods，challenges，and opportunities. Annual Review of Biomedical Engineering，(9)：205～228

Jason Moffat，Dorre A Grueneberg，Xiaoping Yang，et al. 2006. Lentiviral RNAi Library for Human and Mouse Genes Applied to an Arrayed Viral High-Content Screen. Cell，124，1283～1298

Juha Kononen，Lukas Bubendorf，Anne Kallionimeni，et al. 1998. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. Nature Medicine，(4)：844～847

Ross DA，Lee S，Reiser V，et al. 2008. Multiplexed assays by high content imaging for assessment of GPCR activity. J Biomol Screen，13(6)：449～455

Taylor IW，Linding R，Warde-Farley D，et al. 2009. Dynamic modularity in protein interaction networks predicts breast cancer outcome. Nat Biotechnol，(27)：199～204

Tu Z，Wang L，Arbeitman MN，et al. 2006. An integra-tive approach for causal gene identification and gene regulatory pathway inference. Bioinformatics，22(14)：489～496

撰稿人：李　征　李桂源

中南大学

肿瘤细胞如何转移到远隔器官

How Do Tumor Cells Metastasize to the Distant Organs

大多数肿瘤患者最终死于肿瘤的侵袭和转移。以结直肠癌为例，如果肿瘤没有转移，外科手术的治疗方法可以是根治性的；但是如果发生了肝脏、肺或脑的转移，患者的预后非常差，将直接威胁生命。大量临床研究表明，结直肠癌患者即使只是发生了淋巴结的转移，其预后也明显变差。因而揭示肿瘤转移的本质将从根本上改变恶性肿瘤的治疗前景。

1. 肿瘤转移涉及一系列复杂的生物学步骤

肿瘤转移是一个多步骤、多阶段、多途径，涉及多基因变化的复杂过程。这一系列复杂的步骤称为“侵袭-转移级联反应”，具体包括局部浸润、血管内渗（intravasation）、转运、血管外渗（extravasation）、形成微小转移灶和局部克隆性生长六个步骤。

长期以来一直以为转移是肿瘤发生的晚期事件。目前大量的证据表明，肿瘤的转移很早就已经发生。由于肿瘤细胞完成转移的各个步骤均是耗时的过程，形成肉眼可见的转移灶需要相当长时间。

根据肿瘤转移的本质，肿瘤转移的过程可以简化为三个阶段，即将局部浸润、血管内渗、转运、血管外渗、形成微转移合并为第一个阶段；第二阶段涉及克隆化能力的获得；第三阶段为微转移发展为可见的转移灶，并致肿瘤的复发和远隔器官的转移。

2. 肿瘤转移的模型

目前对肿瘤转移的认识可以概括为三种模型。第一种模型表明，在肿瘤发生的较晚阶段，原发肿瘤内的极少数瘤细胞在基因突变积累到一定程度后获得转移能力。由于基因突变的累积与肿瘤转移相关基因的活化或抑制是随机的，因而这一模型称为肿瘤转移的随机模型（即经典的肿瘤转移模型）。这一模型，肿瘤转移相关基因的改变主要在原发肿瘤的少数细胞中发生，随着肿瘤发生时限的增加，其转移能力也相应增加。第二种模型认为，转移是肿瘤发生的早期事件，原位癌中部分肿瘤细胞已具有转移癌的分子特征。近期有关肿瘤干细胞的研究认为，在腺瘤形成晚期有迁移肿瘤干细胞的存在，而迁移肿瘤干细胞是形成转移的重要基础。第三种模型综合了前两种模型的特点。转移是少数肿瘤细胞的特权还是多数肿瘤细胞的特性仍需要大量的证据去明确。

3. 肿瘤细胞转移特性的异质性

原发肿瘤细胞在各种生物学特性包括转移特性方面的差异即为肿瘤细胞的异质性。肿瘤细胞内在的基因组不稳定性是肿瘤细胞转移特性的异质性主要根源。肿瘤相关的染色体增多、缺失、重排与肿瘤细胞基因组不稳定和异质性相关。DNA 的完整性受到损害可危及细胞周期进程，导致端粒功能的障碍、细胞遗传学异常与染色体不稳定等。

4. 肿瘤转移的分子基础

在肿瘤细胞的浸润和转移过程中，有多种基因参与，它们促进或抑制肿瘤转移的发生。在肿瘤的发生发展中存在大量的癌基因及抑癌基因的功能失调，它们的功能失调参与肿瘤转移的各个阶段。

目前发现的肿瘤转移相关基因数量非常之多，其中有不少基因在肿瘤的发生中也起着非常重要的作用。仅将某些基因确认为肿瘤转移相关基因是比较粗糙的，应该明确其作用于肿瘤转移的关键阶段。

根据相关基因参与肿瘤转移的具体步骤可以将肿瘤转移相关基因分为以下几类：第一类为肿瘤启动相关基因，如 KRAS、BRAF、EGFR、HER2、PI3K 、APC、p53、PTEN、BRCA1 及 VHL1 等。它们部分属于癌基因，部分属于抑癌基因，与肿瘤细胞无限的增殖潜力、生存及基因组不稳定性有关。第二类为转移启动相关基因，与肿瘤细胞的浸润、血管内渗及转运、血管形成、上皮间叶转化（epithelial mesenchymal transition，EMT）有关。第三类为转移进展相关基因，与肿瘤细胞的血管重构、免疫逃逸、血管外渗等有关。第四类为转移毒力基因，与肿瘤细胞器官特异性的功能有关。

确定肿瘤转移的分子基础具有十分重要的意义。由于认为肿瘤转移过程是由一组相关基因启动，因而除经典的单个基因的功能研究模式之外，对由一群基因组成的分子标签（molecular signature）在肿瘤转移中的作用也受到重视。首先这种肿瘤转移相关的分子标签对于肿瘤转移风险预测及预后判断具有非常重要的作用，另外它们共同参与肿瘤转移的关键步骤，为肿瘤转移的鸡尾酒式的疗法奠定了基础。无疑，发现和确定肿瘤转移关键基因在相当长的一段时间仍将是肿瘤转移领域研究的重要内容。

目前已经发现了很多在肿瘤转移过程中起重要作用的分子，但是有一些关于肿瘤转移的本质问题尚需要回答。为什么在肿瘤转移过程中，肿瘤细胞会发生如此的变化？它获得的起始信号到底是什么？真的有特异性参与肿瘤转移的分子吗？

基因突变是影响肿瘤转移过程中相关分子的重要基础。除此之外，调控肿瘤转移的表观遗传因素、遗传学与表观遗传学因子之间的相互作用无疑是将来需要回答的重要问题。

5. 肿瘤细胞的侵袭：上皮间叶转化

发生转移首先须局限性侵袭，这需要原发部位的肿瘤细胞发生许多表型改变。上皮间叶转化（epithelial mesenchymal transition，EMT）就是肿瘤细胞失去许多上皮细胞的表型而获得间叶细胞的形态，从而获得运动和侵袭的能力。EMT普遍存在于胚胎发育过程，与某些形态发生和组织重建有关，在创伤修复过程中也存在EMT这一改变，这提示肿瘤的侵袭与正常胚胎发育和创伤修复存在高度的相似性。EMT过程中，与这种表型的改变相一致同时存在其基因型的改变。肿瘤细胞EMT表型是完全可逆的，一旦肿瘤细胞完成了侵袭转移过程，它们还要经过间叶上皮转变（mesenchymal epithelial transition，MET）而恢复上皮样细胞表型。EMT与MET的互相转化表明肿瘤细胞侵袭能力的改变并不主要是由于肿瘤细胞基因突变的累积，而是取决于相关表观遗传学因子，Snail、Slug、Twist、SIP1及FOXC2等在胚胎发育中起关键作用的转录因子以及小分子RNA在肿瘤细胞的EMT过程中起重要作用。

近来有趣的发现是将EMT与肿瘤干细胞联系在一起。有研究证据发现，将肿瘤细胞人工诱导EMT，其肿瘤细胞具有肿瘤干细胞的表型。因而启动EMT的重要因子同样参与肿瘤细胞的重新编程（reprogramming）。这给肿瘤干细胞的研究带来新的冲击，肿瘤细胞可以重新编程为肿瘤干细胞。EMT及肿瘤细胞向肿瘤干细胞的转化是否是肿瘤细胞重新编程的具体体现呢？肿瘤细胞的重新编程在肿瘤转移中的作用无疑是一个更大范围内的课题。

值得关注的是参与EMT的重要转录因子它们本身很少发生突变，它们的开放到底是由何种信号启动的呢？是源于细胞恶性转化之后的延续，还是来源于其他一种特定的异源信号呢？

6. 启动肿瘤转移的关键信号：微环境在肿瘤转移中的作用

肿瘤细胞在侵袭及转移的过程中发生了急剧的变化，这种急剧的变化一定是由某种信号启动和维持的。这种信号很可能来源于肿瘤细胞周围的微环境。微环境的变化如缺氧及营养缺乏、低pH、炎症因子及TGF-β等相关信号在启动肿瘤细胞转移中起关键作用。研究观察到，发生EMT改变的肿瘤细胞往往处在肿瘤上皮与间质的交界处（或称为肿瘤浸润前缘）。一直以来在肿瘤的研究中人们更多地关注于肿瘤实质即肿瘤细胞自身的改变，而肿瘤间质在肿瘤的发生、演进及转移中同样发挥着重要作用。肿瘤的这些间质成分包括成纤维细胞、肌成纤维细胞、巨噬细胞、血管内皮细胞、淋巴细胞等，它们提供着启动肿瘤转移的关键信号。与针对肿瘤细胞自身的大量研究相比，这是一个相对较薄弱但又令人激动的领域。在肿瘤转移的研究设计中，许多研究方法要随之而做出改变。例如裸鼠模型并不是研究肿瘤转移的合适模型，它忽略了重要的微环境信号。制作出符合人类肿瘤特征的肿瘤转移模型对于解构肿瘤转移过程中肿瘤细胞与微环境之间的相

互作用具有重要的作用，也是我们肿瘤转移研究中需要解决的基本工具。

7. 克隆形成：土壤和种子

许多肿瘤细胞转移后并不能成功形成转移灶，属于无效转移。克隆形成是转移所有阶段中的限速步骤。在肿瘤转移的过程中，肿瘤细胞获得克隆形成的能力与向远隔器官播散的能力是有区别的。来源于原发部位的许多肿瘤细胞均可播散至全身，但它们大部分并不具有克隆形成能力，很少能形成肉眼可见的转移灶，产生这种情况的原因是新的组织环境无法提供迁移的肿瘤细胞合适的微环境。19世纪英国外科医生 Stephen Paget 提出的土壤和种子学说很好地说明了新的肿瘤微环境对于转移的肿瘤细胞的选择作用。这也在一定程度上可以解释部分肿瘤的嗜器官性转移，如乳腺癌易转移至骨、肺、脑；前列腺癌易转移至骨；结直肠癌易转移至肝脏。确定肿瘤嗜器官性转移的规律将有助于发现调节肿瘤细胞克隆形成的关键因子。

8. 有转移干细胞吗

按照肿瘤干细胞的理论，肿瘤干细胞是存在于肿瘤细胞内少数具有自我更新和多向分化潜能的肿瘤细胞。那么它就应该可以产生生物学特性包括转移特性各异的肿瘤细胞，这些细胞是转移干细胞吗？转移干细胞难道又是肿瘤干细胞中的少量群体吗？最接近转移干细胞的概念是 Thomas Brabletz 在 2005 年提出的迁移肿瘤干细胞的设想。不久转移干细胞在胰腺癌中也获得了初步的证实。

但是近年来的研究逐渐打破了肿瘤细胞与肿瘤干细胞之间的界限，肿瘤细胞在某些情况下可以逆向转化为肿瘤干细胞。如同强制同时转入多个转录因子可以使得分化细胞变为全能干细胞一样，转入 EMT 相关调控因子也可将肿瘤细胞变为干细胞样肿瘤细胞。这种重新编程是如何完成的无疑是肿瘤转移研究的一大挑战。

参考文献

Brabletz T, Jung A, Spaderna S, et al. 2005. Opinion: migrating cancer stem cells—an integrated concept of malignant tumour progression. Nat Rev Cancer, 5(9): 744～749

Chiang AC, Massagué J. 2008. Molecular basis of metastasis. N Engl J Med, 359(26): 2814～2823

Fidler IJ. 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the "seed and soil" hypothesis revisited. Nat Rev Cancer, 3(6): 453～458

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. 2010. Immunity, inflammation, and cancer. Cell, 140(6): 883～899

Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al. 2007. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. Cell Stem Cell, 1(3): 313～323

Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. 2008. The epithelial-mesenchymal transition generates cells

with properties of stem cells. Cell, 133(4): 704～715

Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, et al. 2005. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. Nature, 436(7050): 518～524

Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, et al. 2003. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. Nat Genet, 33(1): 49～54

Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, et al. 2008. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. Nature, 451(7175): 147～152

Weinberg RA. 2007. The Biology of Cancer. New York: Garland Science

撰稿人:李建明
南方医科大学

肿瘤易感基因（群）与环境的交互作用机制

Interaction Mechanism of Tumor Suppressor Gene（Cluster）with Environmental Factors

1. 背景

恶性肿瘤的发生发展是一个多步骤、多因素参与的复杂过程，存在基因组不稳定性，易受环境中理化和生物致癌因素的攻击。其发生机制不仅涉及遗传因素（基因）的参与，环境因素在其中也发挥非常关键的作用。世界卫生组织调查结果表明，70%～80%的人类恶性肿瘤与环境因素存在直接或间接的关系。特别是乳腺癌、结直肠癌、肝癌、宫颈癌、肺癌、食管癌、胃癌、白血病和鼻咽癌等严重危害人类生命健康的常见恶性肿瘤均属于多基因肿瘤，涉及多个基因的参与，并存在比较明确的环境致癌因素，是遗传因素与环境因素交互作用的复杂性疾病。

2. 科学意义

流行病学调查研究结果表明，各种电离辐射和紫外线照射可以引起白血病和皮肤癌；环芳烃化合物（如3,4-苯并芘）可以引起肺癌；黄曲霉素可以诱发肝癌；亚硝酸盐可以引起各种消化道肿瘤；某些病毒（如EB病毒、人乳头状瘤病毒等）与鼻咽癌、宫颈癌等密切相关。这些环境理化、生物致癌因素均是通过影响基因异常而导致肿瘤发生的。同时，这些容易受到攻击的基因有些就是肿瘤易感基因。由于基因组的不稳定性，使得这些易感基因存在某种（些）遗传缺陷即生殖细胞突变或某些基因多态性变异型，从而容易受到环境致癌因素的攻击而导致肿瘤的发生。对多基因肿瘤而言，肿瘤易感基因可能不止一个，而是一组或一群。BRCA1、BRCA2是较早确证的两个乳腺癌遗传易感基因，其突变能导致妇女患乳腺癌的风险增加45%～100%。鼻咽癌家系也报道存在两个遗传易感区，即广东鼻咽癌的4p11—p14区和湖南鼻咽癌3p21.31—q21.2区，同时发现BRD7中C450T和A737C两个偶联的多态性改变、NGX6上游调控区的一个SNP rs879284、p53第73外显子Pro/Arg的多态性改变与散在鼻咽癌发病存在显著关联。这些证据支持多基因肿瘤存在多个或一群遗传易感基因，是肿瘤多阶段发病过程中环境致癌因素的重要靶点。对于基因-环境交互作用的深入研究，有助于了解人群易感性差异的原因，进而可以对基因与肿瘤、环境与肿瘤、基

因与环境的关系有更深入的认识，确定其交互作用的模式。因此，从病因发病学的角度研究多基因肿瘤的遗传因素与环境因素交互作用将是癌变原理研究领域的重大突破。

3. 最新进展

近年来，关于“环境-基因交互作用致癌”的报道不多，但已有的研究表明，易感基因主要通过影响细胞的生化代谢、免疫监视或细胞分裂而促进肿瘤发生。着色性干皮病患者易患皮肤癌，这是由于 DNA 修复酶的缺陷导致细胞的恶性改变；环境中获取的各种芳烃（如吸烟）能被体内芳烃羟化酶活化成致癌的多环芳烃，从而促进肿瘤的发生；许多免疫缺陷患者都有易患肿瘤的倾向，例如无丙球蛋白血症患者易患白血病和淋巴系统肿瘤等。Epstein-Barr（EB）病毒是目前公认的鼻咽癌致癌因素之一，其瘤基因可整合到正常鼻咽上皮内引起组织细胞异常增殖而发生癌变；最近又发现了另外一种与鼻咽癌发生密切相关的微生物——纳米细菌，这种纳米细菌能募集磷酸钙到鼻咽上皮细胞周围，可能介导或加快 EB 病毒及其基因组进入鼻咽上皮细胞内，从而导致鼻咽细胞的恶性转化。SPLUNC1 是一个天然免疫固有保护分子，在鼻咽癌发病的极早期即发生表达缺失或下调，是鼻咽癌发病的早期诊断分子标志物；同时，其表达丢失能够加速上述分子事件的发生。说明“SPLUNC1-纳米细菌-EB 病毒-鼻咽癌”是鼻咽癌发病的又一个重要分子机制（图 1）。

4. 主要难点

“环境-基因交互作用致癌”已是不争的事实。但由于多基因肿瘤发病的多阶段性，存在多个遗传易感基因（群）和多个环境致癌因素的参与，使得恶性肿瘤发病的分子机制研究异常复杂，存在系列科学难题。在恶性肿瘤多阶段发病过程中，易感基因（群）只有在环境致癌因子的作用下发挥致癌效应，但二者之间的交互作用是如何启动的？不同类型的环境致癌因子是否具有与易感基因（群）交互作用的特殊模式？或二者之间的交互作用是否在不同肿瘤中存在普遍规律和特殊规律？其机制是什么？这些都是迄今肿瘤研究领域的难点。

5. 展望

随着现代分子生物学、遗传学、细胞生物学、生物信息学和分子流行病学等技术的发展以及各学科之间的广泛交叉，各种基因-环境交互作用的研究方法运用而生。通过对肿瘤易感基因的定位克隆研究、环境致癌因素的筛查、基因功能研究和动物模型的建立等，不仅可以确定肿瘤相关的环境致癌因素和肿瘤不同发病阶段的易感基因（群），更重要的是确定环境-基因交互作用的模式，从而阐明多基因肿瘤发病的分子机制，为恶性肿瘤的早期分子诊断和个体化治疗奠定坚实的基础。

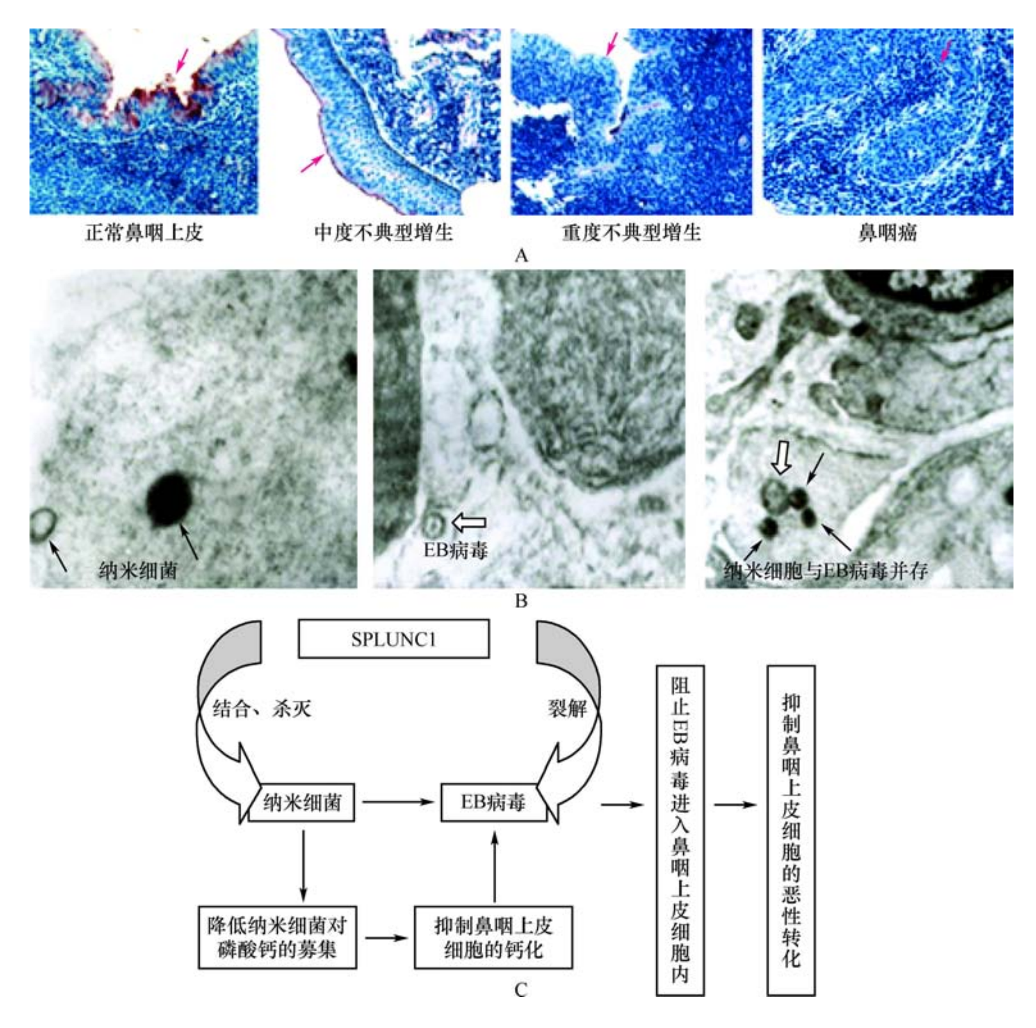


图 1　SPLUNC1、纳米细菌、EB 病毒与鼻咽癌发病的关系

A. 免疫组化检测 SPLUNC1 蛋白表达与鼻咽癌发病的关系；B. 电镜观察纳米细菌与 EB 病毒并存（标注见图示）；C. SPLUNC1、纳米细菌和 EB 病毒参与鼻咽癌发病的可能机制

参考文献

陈汉奎，冯柄建，梁慧，等. 2003. 单体型分析将家族性鼻咽癌易感基因定位于 4p11—p14 区域. 科学通报，48(16)：1776～1779

Danai Tiwawech，Petcharin Srivatanakul，Anant Karaluk，et al. 2003. The p53 codon 72 polymorphism in Thai nasopharyngeal carcinoma. Cancer Lett，198(1)：69～75

Feng BJ，Huang W，Shugart YY，et al. 2002. Genome-wide scan for familial nasopharyngeal carcinoma reveals evidence of linkage to chromosome. Nat Genet，31(4)：395～399

Hall JM ,Lee MK , Newman B ,et al. 1990. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. Science , 250 : 1684～1689

Wooster R , Bignell G , Lancaster J ,et al. 1995. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. Nature , 378(6559) : 789～792

Xiong W , Zeng ZY , Xia JH ,et al. 2004. Susceptibility locus at chromosome 3p21 linked to family nasopharyngeal carcinoma. Cancer Research ,64(6) : 1972～1974

Zeng Z , Zhou Y , Zhang W ,et al. 2005. Family-based association analysis validate chromosome 3p21 as a putative nasopharyngeal carcinoma susceptibility locus. Genetics in Medicine , 8(3) : 156～160

Zhou HD , Li GY , Yang YX ,et al. 2006. Intracellular co-localization of SPLUNC1 protein with nanobacteria in nasopharyngeal carcinoma epithelia HNE1 cells depended on the bactericidal permeability increasing protein domain. Mol Immunol , 3(11) : 1864～1871

Zhou HD , Li XL , Li GY ,et al. 2008. Effect of SPLUNC1 protein on the pseudomonas aeruginosa and Epstein-Barr virus. Mol Cell Biochem , 309(1～2) : 191～197

撰稿人:周　鸣　李桂源

中南大学

非典型性趋化因子受体的抗癌作用及其人工模拟

Anticancer Role and Artificial Mimics of Atypical Chemokine Receptors

趋化因子（chemokine）是一大类可趋化并激活白细胞的小分子质量蛋白质，依其N末端半胱氨酸残基的排列顺序可分为C、CC、CXC和CX_3C等4个亚家族，迄今发现的成员已逾50个，其相应受体XCR、CCR、CXCR和CX_3CR计约20个。趋化因子及其受体在肿瘤中的作用广泛而复杂，CXCL8（IL-8）、CXCL12（SDF-1）、CCL2（MCP-1）和CCL5（RANTES）等趋化因子具有促癌作用，而XCL1（Ltn）、CXCL9（Mig）、CXCL10（IP-10）、CXCL14（BRAK）、CCL16（LEC）、CCL19（ELC）和CCL28（MEC）等则发挥抗癌作用。趋化因子可能充当肿瘤微环境中重要的驱动分子，已证实乳腺癌向肺、淋巴结的转移与CXCL12-CXCR4轴、CCL19/21-CCR7轴的活动有关，间充质干细胞增强乳腺癌细胞转移能力是通过CCL5/CCR5旁分泌作用方式来实现的。

2001年Zlotnik等观察到表达CXCR4和CCR7的乳腺癌细胞，可转移到高表达其配基CXCL12、CCL21（6Ckine）的肺、肝及淋巴结等靶器官，抗CX-CR4的抗体可使人乳腺癌细胞系MDA-MB-231在CB-17 scid小鼠的肺转移率下降61%～82%。这一发现引起了极大的轰动，由此揭开了趋化因子学研究史上新的一页。CXCR4在乳腺癌中的阳性率高达60%，由于CXCR4也是人类免疫缺陷病毒（HIV）侵入T细胞的辅助受体，因此以CXCR4为靶点的药物也许可以收到“一箭双雕”的效果。目前研究中的CXCR4拮抗剂异彩纷呈，既有经典的小分子拮抗剂AMD3100、AMD3465、AMD070、TN14003和CTCE9908，也有作用更为强大的肽类拮抗剂Pol 3026等。2009年美国FDA已经正式批准CXCR4拮抗剂AMD3100的注射液Plerixafor（Mozobil，普乐沙福）上市。CXCR4肽类拮抗剂CTCE-9908已被证实可抑制小鼠骨肉瘤和黑色素瘤的肺转移。抗CXCR4抗体在美国已经进入临床试验阶段，也许不久就可成为肿瘤生物治疗药物中的奇葩。

然而，趋化因子及其受体为数众多，采用既往的单一靶点治疗策略可能并非适宜。临床上针对单一靶点的抗体、小分子拮抗剂、反义核酸、核酶、siRNA等往往效果有限。最近一些趋化因子受体拮抗剂临床试验的意外失败，强烈提示对趋化因子网络的多靶点调控尤其有必要，迈向多向药理学（polypharmacolo-gy）时代势在必行。人们设想，趋化因子及其受体所构成的网络在机体内可能受

神经、激素、细胞因子、酶及趋化因子结合蛋白等迅速而严密的综合调节，而由此入手也许能收到“纲举目张”的效果。非典型性趋化因子受体（atypical chemokine receptors，ACR）是一类重要的趋化因子结合蛋白，也被称为诱饵受体、沉默受体、清除槽、清道夫或内化受体，已知的 ACR 包括 Duffy 抗原趋化因子受体（Duffy antigen receptor for chemokines，DARC）、D6、CCX-CKR（ChemoCentryx chemokine receptor）和 CRAM-B（chemokine receptor on activated macrophages-B）等。ACR 可能在体内趋化因子网络平衡的调控中发挥着关键性的作用，阐明其在肿瘤转移复发中的作用不仅具有重要的理论意义，而且可能具有潜在的临床应用价值。ACR 司趋化因子的转录后调控，其广谱趋化因子结合特性与强大的趋化因子清除能力引人注目。新近研究表明多种 ACR 均在乳腺癌中发挥负性调节作用，DARC、D6 和 CCX-CKR 三重阳性乳腺癌患者的腋窝淋巴结转移少而生存率高，提示在乳腺癌中这些 ACR 具有协同作用，其共表达可为患者提供更好的保护。DARC 抑制肺癌、前列腺癌及黑色素瘤的作用也已得到一些实验室研究资料的支持。DARC 的抗癌作用不仅归因于其对成血管性趋化因子 CXCL8、CCL2 等的有效清除，也可能涉及广泛意义上的基因调控，如在前列腺癌其抗癌作用已被证实与前列腺癌转移抑制基因 KAI1（Kang Ai 1，抗癌 1 号基因）有关。D6 除可抑制乳腺癌外，据报道也可抑制皮肤癌及大肠癌。在 D6 缺失的小鼠可观察到佛波酯所致的皮肤肿瘤负荷增加，而 D6 转基因角化细胞则可抑制皮肤肿瘤形成。D6 缺失的小鼠也易患大肠炎相关性癌症。

虽然各种 ACR 具有不同的靶分子谱，如 DARC 只结合促血管生成性 CXC 和 CC 趋化因子，D6 主要针对炎性 CC 趋化因子，CCX-CKR 的靶分子则是一些司内环境稳定的趋化因子，然而在乳腺癌中的作用异曲同工，提示它们在趋化因子网络中可独立或协同发挥负性调控作用。值得一提的是，在 CC 趋化因子中有些受 DARC 和 D6 的双重调控（CCL2、5、7、11、13、14、17）或 CCX-CKR 和 CRAM-B 的双重调控（CCL19），也有些只受 D6 的调控（CCL4、8、12、22）或只受 CCX-CKR 的调控（CCL25），意义不明。在进化史上高度保守的 ACR 很有可能都是一些极其重要的多靶点、多功能分子，其神秘的面纱尚待彻底揭开。鉴于在实验研究中 DARC、D6、CCX-CKR 单独过表达即可在很大程度上左右趋化因子网络平衡，影响肿瘤微环境，使乳腺癌细胞的生物学行为发生显著的改变，推测其决定性的优势可能在于作用的广谱性，相信围绕这些特殊分子的深入研究将使趋化因子的多靶点高效调控成为可能，也有助于阐明炎症与肿瘤的关系。

事实上，自然界中不乏 ACR 的故事。一些病毒编码的 ACR 如 M-T7、M-T1、CrmB、M3、pUL21.5、glycoprotein G、US28 及寄生虫编码的 ACR 如 smCKBP、Evasin 等的相继发现，更使人们意识到此类分子的潜在应用价值。近

来有人从寄生于犬身上的褐色犬蜱的唾液腺中分离到一种称为 Evasin 的趋化因子结合蛋白，它可有效而特异性地中和多种趋化因子，已知 Evasin 1 可结合 CCL3、CCL4 和 CCL18，Evasin 3 可结合 CXCL1 和 CXCL8，而 Evasin 4 可结合 CCL5 和 CCL11。分泌型 Evasin 作为这种聪明的寄生虫为便于驻留吸血而平息宿主局部炎症反应的一种策略，是一类高效的广谱趋化因子灭活蛋白，这给了人们极大的遐想空间。人工合成的多靶点肽类杂性趋化因子拮抗剂也已问世，其中 BKT130 可有效地抑制 6 种趋化因子，包括 3 种 CC 趋化因子（CCL2、5、11）和 3 种 CXC 趋化因子（CXCL9、10、11）。

趋化因子具有分子质量小（约 10 000Da）、略呈碱性、富含半胱氨酸、可形成 2 对二硫键等基本结构特征。参考 Evasin 和 BKT130 的范例，基于趋化因子的特性及 ACR 趋化因子结合袋（chemokine binding pocket）的构象进行 ACR 分子模拟，筹谋全新的实用性多靶点趋化因子调控手段不仅是非常必要的，也是完全可能的。在解析 ACR 构效关系的基础上进行趋化因子结合袋的体外翻译，鉴别体内天然存在的可溶性 ACR，从生物界或中药中寻找诸如 Evasin 那样的高效广谱趋化因子灭活物，采用蛋白表型模拟（protein epitope mimetics，PEM）技术设计并合成 ACR 模拟分子也许都是不错的选择，至少可以积累经验和逐步逼近目标。虽然 ACR 的人工模拟绝非易事，面临着空前的理论和技术挑战，却也蕴藏着无限的希望。相信不久的将来，人们可望明察趋化因子网络之秋毫，掌握干预炎症-肿瘤进程和驾驭肿瘤微环境的钥匙，找到基于非典型性趋化因子受体的多靶点、高效和特异性肿瘤治疗的新途径。

参考文献

Mantovani A, Savino B, Locati M, et al. 2010. The chemokine system in cancer biology and therapy. Cytokine Growth Factor Rev, 21(1):27～39

Wang JM, Chertov O, Proost P, et al. 1998. Purification and identification of chemokines potentially involved in kidney-specific metastasis by a murine lymphoma variant: induction of migration and NFkappaB activation. Int J Cancer, 75(6):900～907

Muller A, Homey B, Soto H, et al. 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature, 410(6824):50～56

Wang J, Ou ZL, Hou YF, et al. 2006. Enhanced expression of Duffy antigen receptor for chemokines by breast cancer cells attenuates growth and metastasis potential. Oncogene, 25(54): 7201～7211

Bandyopadhyay S, Zhan R, Chaudhuri A, et al. 2006. Interaction of KAI1 on tumor cells with DARC on vascular endothelium leads to metastasis suppression. Nat Med, 12(8):933～938

Wu FY, Ou ZL, Feng LY, et al. 2008. Chemokine decoy receptor D6 plays a negative role in human breast cancer. Mol Cancer Res, 6(8):1276～1288

Feng LY, Ou ZL, Wu FY, et al. 2009. Involvement of a novel chemokine decoy receptor CCX-CKR in breast cancer growth, metastasis and patient survival. Clin Cancer Res, 15(9):2962～2970

Cheng X, Hung MC. 2009. Regulation of breast cancer metastasis by atypical chemokine receptors. Clin Cancer Res, 15(9):2951～2953

Horuk R. 2009. Chemokine receptor antagonists: overcoming developmental hurdles. Nat Rev Drug Discov, 8(1):23～33

Deruaz M, Frauenschuh A, Alessandri AL, et al. 2008. Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. J Exp Med, 205(9):2019～2031

撰稿人：欧周罗
复旦大学

神经发生的机制

Mechanisms Underlying Neurogenesis

哺乳动物中枢神经系统由外胚层分化而来，经历细胞的增殖、迁移、分化等复杂的过程，形成各种生物特定的脑结构，决定各种各样的行为和脑高级功能。由于高等生物的神经系统更为复杂，多年来，人们采用多种简单的系统和模式生物阐述神经发生的基本原理，以期找出共性。尽管已积累了大量的知识，但关于人和其他动物大脑的区别却还是未解之谜，了解神经发育基本原理对于人类认识自我是一项长期的任务。下面从神经发育的基本过程讨论神经发生的主要科学问题。

1. 神经元的增殖

以前的观点认为，神经前体细胞的增殖发生于动物胚胎期或出生后的早期，然而，近年来的研究结果逐步改变了这一观念。实际上，在成年大鼠海马的齿状回和嗅球已发现成体神经干细胞和新生神经元，而且这些神经元能整合到原已存在的神经环路，但是这些新生神经元对神经网络和脑功能的影响尚不清楚。另外，成年脑中的神经发生既受生理因素的调节，如生长因子、激素、神经递质等，还受到环境因素的调节。随着胚胎和成体神经前体细胞特异标志分子的发现，人们可以精确地干预成体神经干细胞的产生，以观察对动物行为的影响。由于现有模式生物难以完全模拟人类高级脑功能，需要以非人灵长类动物为模型，研究神经发生与行为的关系。关于胚胎神经干细胞、神经前体细胞库如何被精确维持、如何在增殖和分化之间进行平衡、不同物种之间有何区别等问题都有待回答。

2. 神经元的命运决定和形态发生

有丝分裂后的新生神经元要实现其功能，需要分化为具有特定递质表型的神经细胞。一般来讲，神经元分泌特定的神经递质（如兴奋性的谷氨酸、抑制性的γ-氨基丁酸，或者其他递质如单胺类），这种排他性是如何决定的尚不清楚。除转录因子外，表观遗传学调控，包括 DNA 的甲基化修饰和组蛋白特定位点的乙酰化和甲基化修饰，是基因表达调控的另一种重要方式。这些因素的综合作用，开启或关闭基因的表达，精确决定细胞命运。神经分化的另外一个主要问题是形态发生。一般来讲，神经元通过轴突输出信息，通过树突接受信息，这种不同神经突之间形态和功能的分化称为神经元的极性建立。该过程是决定神经元特殊功

能的结构基础，但发生机制尚需阐明。决定轴突发育的最初事件是什么；是否需要胞外信号；细胞黏附对神经元形态发生的影响如何；神经元形态发生与细胞迁移的关系；等等。除了具有共性，不同神经元在形态上具有异质性，典型表现是树突的差异，该表型直接决定信号的整合。遗传因素和神经活动如何对神经元形态进行调节也是神经发育的重要问题。

3. 神经元的迁移

新生神经元的有序迁移是形成脑结构的关键环节。举例来讲，大脑皮质分为古皮质、旧皮质和新皮质，动物越高级，新皮质占的比例越高。新皮质具有典型的层状结构，这些层状结构的形成与新生神经元的有序迁移有关。另外，功能核团或"功能柱"均由执行特定功能的细胞群组成，这种神奇的"排兵布阵"到底是如何决定的是未解之谜。与之相关，各类神经元接受多个来源的信息输入，而且通过轴突投射和突触联系实现其功能。由于遗传手段的便捷性及细胞连接的简单性，低等生物（如线虫和果蝇）的细胞迁移、轴突导向及树突铺展现象已逐渐清晰，也有可行的手段研究这些过程对行为的影响。相反，由于高等生物研究手段的局限性，以上大部分过程还是未开垦的处女地。

4. 神经元之间突触联系的建立及环路形成

上级神经元的轴突与下级神经元的树突或胞体形成突触联系。突触形成受到神经活动的影响而不断被精细化。近年来，利用培养的神经元和各种模式生物(如果蝇和线虫)，发现了大量的调节突触前和突触后分化的分子及其机制。由于高等生物的复杂性，其突触形成的分子信息主要从神经元培养系统和神经肌肉接头获得。特异连接如何决定？突触前后的分化如何发生？神经元树突以及突触的过度形成如何"修剪"？这些问题有待深入研究。

近年来，由于成像技术的完善和跨突触标记技术的发展，人们试图解析影响特定行为的神经环路。高等生物中枢神经系统每个神经元平均接受上千的突触输入，大脑神经元之间的连接过于复杂，利用目前的技术解析复杂的神经环路成为不可能完成的任务。以上问题的解决依赖以下手段：新一代高敏感成像技术，光敏感通道激活或抑制特定神经元的神经活动，病毒等跨突触标记手段，大样本的系统电镜分析，更为敏感高效的钙成像和电生理分析等。这些手段的联合运用，可以使我们逐步解析高等生物的脑"连接组"（connectome）。

总之，关于神经发生的基本原理，很多环节尚不清楚。随着新技术的发展，人类将逐渐认识大脑的形成和工作原理，从而逐步认识自我，解析人类"智力发展"这一奇迹。

参 考 文 献

Albert M，Peters AH. 2009. Genetic and epigenetic control of early mouse development. Curr

Opin Genet Dev, 19(2): 113～121

Barnes AP, Solecki D, Polleux F. 2008. New insights into the molecular mechanisms specifying neuronal polarity in vivo. Curr Opin Neurobiol, 18(1):44～52

Cheng L, Arata A, Mizuguchi R, et al. 2004. Tlx3 and Tlx1 are post-mitotic selector genes determining glutamatergic over GABAergic cell fates. Nat Neurosci, 7(5): 510～517

Lichtman JW, Livet J, Sanes JR. 2008. A technicolour approach to the connectome. Nat Rev Neurosci, 9(6): 417～422

Lichtman JW, Sanes JR. 2008. Ome sweet ome: what can the genome tell us about the connectome? Curr Opin Neurobiol, 18(8):346～353

Parrish JZ, Emoto K, Kim MD, et al. 2007. Mechanisms that regulate establishment, maintenance, and remodeling of dendritic fields. Annu Rev Neurosci, 30: 399～423

Pennisi E. 2006. Mining the molecules that made our mind. Science, 313(5795):1908～1911

Zhang F, Gradinaru V, Adamantidis AR, et al. 2010. Optogenetic interrogation of neural circuits: technology for probing mammalian brain structures. Nat Protoc, 5(3): 439～456

Zhao C, Deng W, Gage FH. 2008, Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. Cell, 132(4): 645～660

Zhou Q, Poo MM. 2004. Reversal and consolidation of activity-induced synaptic modifications. Trends Neurosci, 27(7): 378～383

撰稿人:罗振革
中国科学院上海生命科学研究院

钠/钾离子泵如何参与脑功能调节

Sodium Pump in Functional Regulation of Brain

神经元受到外界刺激或感受到其他神经元传递的信号后，通常会产生动作电位，进而在神经元及其神经环路中处理和传导神经信息。神经元为什么会产生动作电位？除了细胞膜上的电压依赖性钠通道和钾通道外，很重要的一个原因是神经元在静息状态下可以维持一个内负外正的膜电位（−70～−60mV），神经元感受到刺激后会产生除极，从而激活钠通道产生动作电位。维持这种内负外正的静息膜电位的主要物质基础是细胞膜上的离子泵，其中最重要的是 Na^+，K^+-ATP酶，也称钠/钾泵。钠/钾泵的主要功能是利用ATP水解产生的能量从细胞内逆电化学式泵出三个 Na^+，同时从细胞外泵进两个 K^+，从而维持神经元的静息膜电位和细胞兴奋性。钠/钾泵还直接或间接控制着细胞的其他功能，如维持细胞容量、细胞内游离钙离子等，并在很大程度上影响与钠离子转运过程相偶联的物质跨膜转运，包括钠/钾/氯离子协同转运、钠/氢离子交换、糖类和氨基酸等物质的转运。另外，钠/钾泵也具有调控胞内信号转导的功能。由于钠/钾泵是调控细胞活动的基本和关键性功能分子，它的发现者Jens C Skou博士于1997年获得诺贝尔化学奖。

钠/钾泵是一种膜蛋白，由一个α亚基和一个β亚基构成的异源二聚体，其中催化、离子转运和药物结合部位均位于α亚基，而β亚基主要帮助α亚基从细胞质向胞膜上转运和正确定位。在有些组织中还存在一种调节亚基γ，其功能尚不明确。目前，钠/钾泵的蛋白质结构已经被解析，α亚基是一个十次跨膜的100～110kDa的蛋白质，β亚基与α亚基的第七个和第十个跨膜段结合，γ亚基则与α亚基的第九个跨膜段结合，从而形成稳定的空间结构（图1）。α亚基有四个亚型α1～α4，β亚基有三个亚型β1～β3，其中α1～α3亚型在神经系统表达，它们的表达具有组织和细胞特异性。目前尚不了解为什么在不同的细胞中有不同的α、β、γ亚基组合及其相应的功能特点，在不同细胞中的亚基组

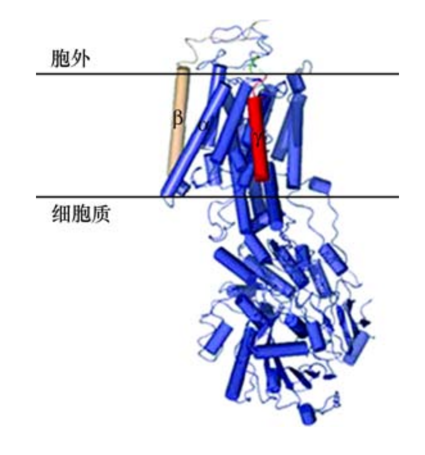


图1　钠/钾泵结构

合与细胞功能调控之间的关系也有待深入研究。既然钠/钾泵是维持神经元等细胞基本活动状态的重要因素之一，那么它在脑等功能的维持和调节中是否有着重要的作用？长期的研究表明钠/钾泵的结构和功能与多种机体功能直接相关。

神经系统是语言、思维、学习、记忆等高级脑功能活动的物质结构基础。神经元是神经系统的基本组成成分，作为一种可兴奋细胞，调控静息膜电位的各种因素均可能对神经元的功能有影响。钠/钾泵作为调控静息膜电位的主要因素，它在神经元兴奋性调控和脑功能调节中起重要作用。抑制钠/钾泵导致细胞内钠离子浓度增加、细胞膜除极、钙离子通道开放、钠/钙离子交换增加，致使细胞内游离钙离子增加，触发一系列钙依赖性效应，如神经递质释放、细胞内信号转导通路激活等，从而改变神经元和神经环路的兴奋性。已有的实验证据表明多巴胺等多种神经递质在激活其受体后，通过细胞内信号转导分子可以调节钠/钾泵的活性，从而调节神经元膜电位和兴奋性。近年来的研究还发现阿片受体等神经递（调）质的受体可与钠/钾泵相互作用，从而介导或调节吗啡、阿片肽等神经递（调）质和药物的功能。然而，这些功能调控和调节的分子与细胞生物学机制有待深入研究，需要解决的核心问题是神经元调控钠/钾泵活性的基本原理及其调控神经元兴奋性的分子与细胞生物学机制，以及参与调控特定神经环路和相应脑功能的机制。这些神经生物学基本问题的阐明可能将会成为我们理解和认识脑功能以及相关脑疾病发病机制的重要一环。

人类疾病遗传学研究已证实神经系统中钠/钾泵的活性改变会导致一些神经功能改变和疾病。如在家族性偏瘫型偏头痛患者中，已发现钠/钾泵上有较多的氨基酸序列位点缺失或突变，已证实这些突变和临床症状有密切的关系；还有一些患者会出现癫痫症状，在老鼠大脑内模拟上述钠/钾泵的位点突变，可以出现严重的癫痫症状，提示上述位点突变导致钠/钾泵的活性降低，不能逆电化学式转运钠和钾，从而使神经元处于除极的状态，神经元易放电，从而出现癫痫症状。在帕金森病、脑缺血和糖尿病性感觉异常（包括慢性痛）等患者中，也存在钠/钾泵的基因突变或活性降低的现象。另外，在一些重症抑郁症患者中红细胞上的钠/钾泵活性明显降低，给予锂盐治疗后好转；中度抑制钠/钾泵的活性也可导致躁狂的发生。因此，钠/钾泵功能异常是许多神经、精神性功能失常的重要因素之一，但是钠/钾泵蛋白质结构异常与其分子功能改变的机制、与神经元兴奋性及脑功能异常的相互关系和调控机制均不甚清楚。值得注意的是，由于钠/钾泵在人体各器官和组织细胞中广泛存在，其功能异常也引起其他疾病。例如在肾性高血压的发病机制中有一定的作用，钠/钾泵的活性增高促进离子转运，从而助长血压升高。临床上见到的洋地黄中毒就是由于过度抑制钠/钾泵的活性导致心肌过度兴奋所致。以往研究还证实提高肺泡钠/钾泵的活性可以明显改善肺损伤、肺水肿的症状。由此可见，在不同系统中钠/钾泵的活性上调或下调对神

经、心血管、呼吸、泌尿等系统功能均有显著影响，是导致疾病的重要因素。因此，在钠/钾泵与脑疾病研究中，应当关注在疾病发生与发展过程中钠/钾泵分子结构改变、钠/钾泵的基因表达改变与调控、影响钠/钾泵活性的神经递（调）质改变和相应神经环路的改变，同时也要注意分析这些改变对机体除了受外源性抑制剂调控外，钠/钾泵活性是否有内在的调节机制？几十年以来人们一直对体内是否存在内源性钠/钾泵拮抗剂或激动剂存有疑问，在早期研究中体功能的影响。

钠/钾泵是临床上心血管用药的一个靶点，经典的抗心力衰竭药物地高辛就是钠/钾泵的 α 亚基抑制剂，这一类源于植物的强心苷的最初使用可以追溯到古埃及时代。目前有一些有关内源性起拮抗作用分子的报道，但仍需要在分子、细胞和组织水平得以进一步证实。最近的研究提示中枢神经元表达的 agrin 可能起钠/钾泵拮抗剂的作用，但其作用的机制仍有待阐明。至今为止，人们尚未发现内源性钠/钾泵激动剂。这方面的研究将使我们了解钠/钾泵功能的调节机制，进而了解钠/钾泵参与脑功能调节的机制，并为减轻或完全缓解相关脑疾病的症状寻找新出路。另外，目前缺少钠/钾泵 α 亚基特异性拮抗剂或激动剂，针对钠/钾泵的亚基组织和细胞分布的特异性，是否可以寻找到特异性的亚基拮抗剂或激动剂，从而尽量减少药物的副作用，这也是一个很有前景的医学和科学问题。最后，如果能够寻找到内源性的拮抗分子或激动分子，或设计药物来激活不再活跃的钠/钾泵，或者通过体内表达正常功能的钠/钾泵等方法，来帮助钠/钾泵活性异常的患者缓解病症，从而为相关脑疾病提供全新的治疗方法。这些研究内容将会成为钠/钾泵调节脑功能中的热点和难点问题。

参 考 文 献

Aperia A. 2007. New roles for an old enzyme: Na^+, K^+-ATPase emerges as an interesting drug target. J Intern Med, 261(1): 44～52

Clapcote SJ. 2009. Mutation I810N in the alpha3 isoform of Na^+, K^+-ATPase causes impairments in the sodium pump and hyperexcitability in the CNS. Proc Natl Acad Sci USA, 106(33): 14085～14090

de Carvalho Aguiar P. 2004. Mutations in the Na^+/K^+-ATPase α3 gene ATP1A3 are associated with rapid-onset dystonia parkinsonism. Neuron, 43(2): 169～175

Kaplan JH. 2002. Biochemistry of Na^+, K^+-ATPase. Annu Rev Biochem, 71: 511～535

Krishnan AV, Kiernan MC. 2005. Altered nerve excitability properties in established diabetic neuropathy. Brain, 128(Pt 5): 1178～1187

Lichtstein D, Rosen H. 2001. Endogenous digitalis-like Na^+, K^+-ATPase inhibitors, and brain function. Neurochem Res, 26(8～9): 971～978

Morth JP. 2007. Crystal structure of the sodium-potassium pump. Nature, 450(7172): 1043～1049

Stam AH. 2008. Genetics of migraine: an update with special attention to genetic comorbidi-

ty. Curr Opin Neurol ,21(3): 288～293

Therien AG ,Blostein R. 2000. Mechanisms of sodium pump regulation. Am J Physiol Cell Physiol, 279(3):C541～566

Xie Z ,Askari A. 2002. Na^+/K^+-ATPase as a signal transducer. Eur J Biochem ,269(10): 2434～2439

撰稿人:李开诚[1] 张 旭[2]

1 中国科学院上海生命科学研究院、海军医学研究所

2 中国科学院上海生命科学研究院

神经肽及受体如何调节脑功能

How Neuropeptide and Their Receptors Modulate Brain Function

神经肽作为一类传递神经信息的分子，在神经系统中有着较广泛的分布。神经肽含量低、活性高、数目惊人、结构迥异、作用广泛而又复杂，扮演着神经递质和神经调质等多种角色，参与调节多种脑功能包括痛觉、睡眠、情绪、学习与记忆等。神经系统本身的分化和发育也受神经肽的调节。

作为神经肽研究的先驱，Von Euler 和 Gaddum 在 1931 年从肠及脑组织中提取出第一个神经肽——P 物质（substance P），揭开了神经肽研究的序幕。而 20 世纪 70 年代多肽化学、放射免疫测定和免疫组织化学技术的发展，迎来神经肽研究的一个蓬勃发展的时期，使得神经肽研究在 20 世纪 80 年代成为神经生物学中最活跃的领域之一。随着分子生物学技术的进展，神经肽的研究更是突飞猛进、日新月异，越来越多的新的神经肽被发现。目前已有上百种神经肽被确认，其中包括 P 物质、血管紧张素、神经肽 Y、甘丙肽、内啡肽、脑啡肽、肠促胰酶肽及胃泌素等。而神经肽受体的克隆，又大大加速了神经肽研究的进程。同时，越来越多的工作证明神经肽及其受体对脑功能起重要的调控作用并与抑郁症、癫痫、阿尔茨海默病和帕金森病等脑重大疾病的发病机制密切相关。近年来随着新兴生物学技术的应用，神经肽的释放和受体转运机制也得到进一步的揭示，但神经肽及受体调节脑功能的机制仍然不甚明了。

已知神经肽在脑内常常与经典神经递质共存，如甘丙肽与去甲肾上腺素和 5-羟色胺分别在蓝斑和中缝背核神经元共存。但与经典递质不同，神经肽主要在突触外释放，迄今为止还没有证据证明神经肽从突触前活动区释放到突触间隙。已有的电镜工作发现，含神经肽的囊泡分布在突触周围区，提示尽管与经典递质共存，神经肽的释放不如后者精确，即轴突末梢上神经肽的释放位点和靶神经元上的相应受体在空间上不是非常紧密。神经肽可以在中枢和外周神经系统离开释放位点一定距离的地方发挥作用，而事实上有时神经肽与其受体的分布存在着的空间错位。因此神经肽除了通过作用存在于相邻局部的受体，也可通过 volume transmission 的形式作用位于一定距离外甚至位于其他核团的受体。此外，几乎所有的神经肽受体均是 G-蛋白偶联受体（GPCR），而 GPCR 介导的作用比经典递质的离子通道型受体要慢得多。因此，神经肽的低表达、长距离和非突触信息传递及 G-蛋白偶联受体介导的慢反应通常被认为是难以确认神经肽及其受体如

何调节脑功能机制的重要因素。同时，缺乏有力的药理学工具如高效特异的非肽类激动剂和拮抗剂等，也是阻碍神经肽重要生理功能阐明的重要原因之一。另外，目前已有的神经肽激动剂和拮抗剂大多为肽类，很难通过血-脑屏障，使得许多相关研究因为给药途径的限制而无法展开。

因此，如何调整思路并结合新兴的实验技术进行多学科交叉研究可能是解决神经肽及受体如何调节脑功能的方向。随着转基因动物技术的发展（如条件基因敲除）和基因沉默（sRNAi）技术的广泛应用，结合生物信息学、分子、生化和生理学等不同的方法，可能有助于阐述神经肽及受体调节脑功能的机制。

参考文献

Hökfelt T, Broberger C, Xu ZQ, et al. 2000. Neuropeptides—an overview. Neuropharmacology, 39: 1337～1356

Leng G, Ludwig M. 2008. Neurotransmitters and peptides: whispered secrets and public announcements. J Physiol, 586: 5625～5632

Ludwig M, Leng G. 2006. Dendritic peptide release and peptide-dependent behaviours. Nat Rev Neurosci, 7: 126～136

Nassel DR. 2009. Neuropeptide signaling near and far: how localized and timed is the action of neuropeptides in brain circuits? Invert Neurosci, 9: 57～75

Salio C, Lossi L, Ferrini F, et al. 2006. Neuropeptides as synaptic transmitters. Cell Tissue Res, 326: 583～598

Xu Z-QD, Zheng K, Hökfelt T. 2005. Electrophysiological studies on galanin effects in brain—progress during the last six years. Neuropeptides, 39: 269～275

Zhang X, Bao L, Ma GQ. 2010. Sorting of neuropeptides and neuropeptide receptors into secretory pathways. Progress in Neurobiology, 90: 276～283

撰稿人：徐志卿
首都医科大学

大脑是如何做计算的

How Does the Brain Compute

在我们貌似平静的日常生活中，大脑无时无刻不在进行大量的复杂计算，如识别物体，做出价值判断，以及参与各种运动。了解大脑的计算原理是我们破译脑的高级功能的关键，也是我们发展具有真正生物智能的机器人的基础。现代计算机尽管在很多方面，如计算的精度和速度，已远远超过了人脑，但在很多与生活技能相关的计算上，如物体识别、运动控制、对环境的适应，以及不断学习新知识的能力，现代计算机与人脑相比还相差很远。一个典型的例子是人脸识别：我们能很快认出分别了十几年的朋友，尽管这个朋友已经有了很大的变化，而计算机视觉目前还无法实现这一点。造成这种差别的原因是大脑采用了与现代计算机完全不同的信息处理方式，简单地说，大脑采用的是由大量神经元组成的网络的平行算法，而现代计算机采用的是串行计算。

我们现在对大脑计算原理的了解还非常肤浅。本文将简单介绍我们已知的有关大脑计算原理的一些基础知识，包括单个神经元的功能，视觉计算的一些基本原则，以及记忆的各种网络模型。通过这些例子我们可以获知当前脑计算研究的一些现状及存在的难题。

神经元是大脑计算的最基本单元。神经元之间连接的主要方式是突触，包含化学突触和电突触。神经元膜电位的变化可以在很大程度上反映神经元的状态变化。当神经元接收到外界输入的信息时，由离子介导的跨膜电流使其膜电位发生变化，当膜电位升高超过一个阈值时，神经元就发放产生一个电脉冲，叫做动作电位，将信息传递到下一级神经元。Hodgkin & Huxley 最早提出一个数学模型来描述单个神经元活动，其核心思想是将受电压调制的离子通道的开和关模拟为电导的变化，从而写出了神经元膜电位变化的动力学方程，为理论上研究脑的计算提供了重要基础（图 1 和图 2）。传统的观点通常认为单个神经元的功能只是一个简单的整合发放过程，但是新的实验数据表明，部分神经元所具有的丰富的树突结构也可能实现一些阈下的复杂计算。同时新的实验也表明，神经元对兴奋性和抑制性输入的整合不是一个简单的线性相加，其中也包含了相乘的非线性作用，叫做分流抑制。要了解单个神经元的计算机制，我们仍然有很多实验和理论的工作要做，其中一个重要的前沿问题是要回答：单个神经元的这些计算特性是否对脑的高级计算有关键性的贡献，抑或它们只是实现脑功能的一种生物学方法？

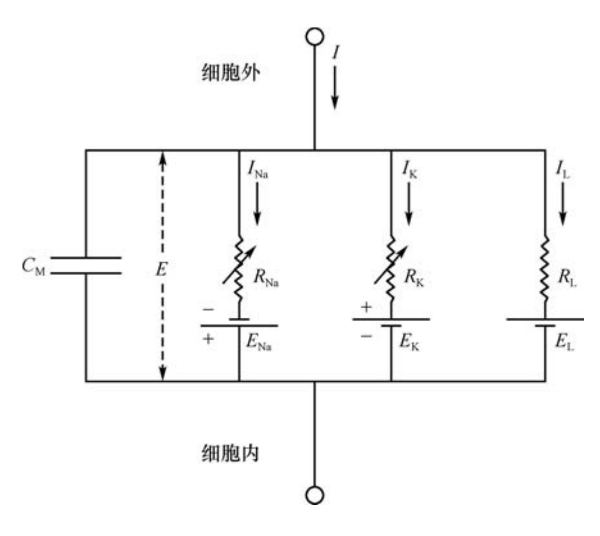


图 1　Hodgkin & Huxley 模型中神经元细胞膜的等效电路图

修改自 Hodgkin，Huxley A. 1952. Journal of Physiology

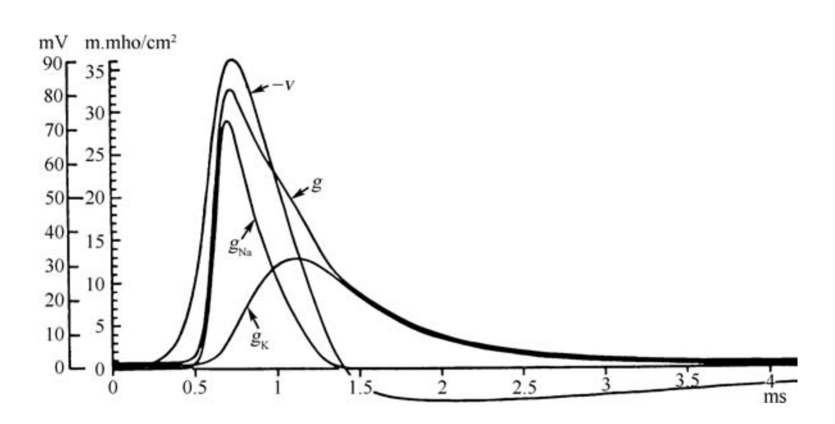


图 2　Hodgkin & Huxley 模型数值模拟动作电位过程中，膜电位、膜电导和钠离子通道、钾离子通道电导的变化

引自 Hodgkin，Huxley A. 1952. Journal of Physiology

大脑中的神经元数目极其庞大，这些神经元连接在一起形成了不同结构的网络。通常认为神经环路是大脑产生各种高级功能的基本结构和功能基础。神经网络的结构决定了网络的动力学性质，进而决定了脑的计算功能，即神经系统对外界刺激的反应特性。因此，了解神经网络的结构和功能之间的关系是破译脑计算原理的关键。下面我们以视觉系统为例来介绍神经计算在网络层次上的一些特性。简单地说，视觉信息通路是一个等级结构，包含视网膜、外侧膝状体、初级视皮质及高级视皮质。视觉信号首先通过视网膜中的感光细胞由光

信号转为电信号，随后经过视神经节细胞的整合形成动作电位，动作电位经过神经纤维传到外侧膝状体，经过处理，再上传到初级视皮质及以上脑区。在整个过程中，神经元对信号的特征提取经历从简单到复杂的过程。例如，视神经节细胞只对微小的光点反应，而初级视皮质上的简单神经元则可以探测有朝向的光栅。这些性质的形成是神经元对大量来自下级神经元群输入整合的结果，因此是一种网络计算（图3和图4）。在初级视皮质及更高的区域，除了下层神经元的输入，神经元也吸收大量来自同层神经元的侧向输入，以及来自高层神经元的反馈输入。这种相互作用的模式决定了神经网络的计算结果不仅仅是对外部输入信号的简单的特征提取，也包含了我们的记忆、对输入的预期及注意力的影响。到目前为止，在实验和理论上，我们对反馈神经网络的工作原理都了解得很少。基于大脑是用网络来做计算的特点，人们发展了人工神经网络的算法。人工神经网络的兴起曾经给人们带来从数学理论上破译大脑计算原理的希望。但是后来几十年的研究表明，这种过分简单化了的网络，因为丢掉了生物系统的很多本质特征，不能刻画大脑的计算功能。当前一个挑战性的前沿问题是发展能描述具有多层等级结构的，特别是具有反馈作用的神经网络的动力学行为的数学工具。

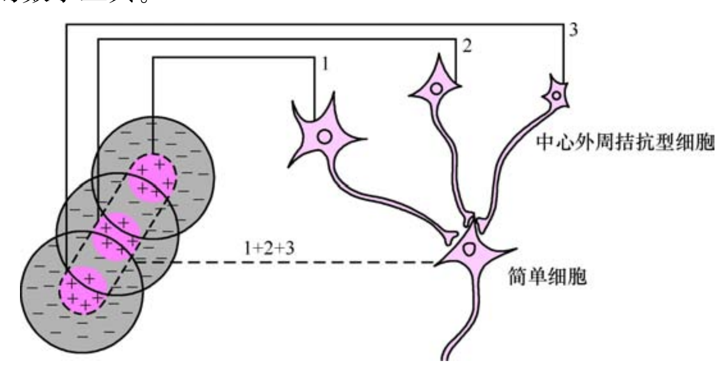


图3　初级视皮质简单细胞的感受野形成模型

简单细胞接受三个以上低层中心周边感受野细胞的输入，形成有方向选择性的条状感受野。

修改自 Eric R Kandel，et al. 2001. Principles of Neural Science

记忆是脑的重要高级功能之一。目前流行的观点认为我们对外界知识的短期记忆是储存在神经网络这个动力学系统的稳定状态之中的，这些稳态在数学上被称为吸引子。Hopfield提出了一个关于记忆的非常简单化的模型，它抓住了神经系统是用网络来做计算的特点，忽略了生物系统的大量细节。该模型的优点是存在一个能量函数，能量函数的极小值对应了网络的记忆状态（图5）。Hopfield模型能很好地解释联想式记忆的产生，即根据部分或模糊的信息，大脑能够正确地形成记忆，但由于它和生物神经网络的巨大差别，远远不足以细致描述脑的记

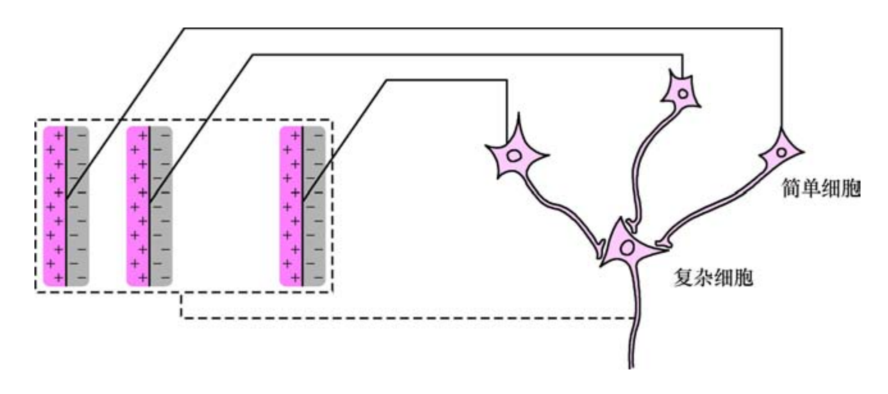


图 4　复杂细胞感受野由接收到的简单细胞的感受野整合形成
修改自 Eric R Kandel, et al. 2001. Principles of Neural Science

忆行为。近年来有关记忆的模型有了新的发展，例如连续吸引子网络。这种模型认为我们对外界物体的记忆在系统的状态空间中形成了连续的子空间，从而可以记忆物体之间的相互关系。近年来，也有理论提出神经元连接的短时程可塑性，例如短时程加强，可以在前额叶形成工作记忆。这些有关记忆机制的理论还有待实验检验。对记忆机制的理论和模型研究将是未来一段时间内脑计算研究的一个重点。

$$E = \frac{1}{2} \sum_{i \neq j} \sum T_{ij} V_i V_j$$

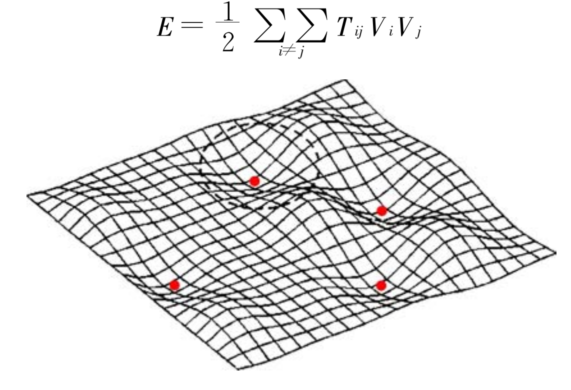


图 5　Hopfield 模型的能量函数图
其中红色圆点表示神经网络动力学系统中的稳定状态，即吸引子

总而言之，破译大脑的计算原理是未来理论和实验神经科学的一个充满挑战性的难题。要取得这方面的突破性进展，既需要我们在实验手段和方法上有大的提高，也需要在理论分析工具上有创新性的进步。这方面的研究还任重而道远，但其中取得的任何重大突破都将对人类的生活产生深远的影响。

参考文献

Amari S. 1977. Dynamics of pattern formation in lateral-inhibition type neural fields. Biological Cybernetics ,27 : 77～87

Bishop C. 1995. Neural Networks for Pattern Recognition. Oxford :Oxford University Press

Hao J , Wang XD , Dan Y ,et al. 2009. An arithmetic rule for spatial summation of excitatory and inhibitory inputs in pyramidal neurons. Proc Natl Acad Sci USA ,106 :21906～21911

Hodgkin A ,Huxley A. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. Journal of Physiology , 117 :500～544

Hopfield J. 1982. Neural networks and physical systems with emergent collective computational abilities. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA ,79 :2554～2558

Kandel E , Schwartz J , Jessell T. 2001. Principles of Neural Science. New York : McGraw-Hill Press

Mongillo G , Barak O ,Tsodyks M. 2008. Synaptic theory of working memory. Science ,319 (5869): 1543～1546

撰稿人:吴　思
中国科学院上海生命科学研究院

怎样早期诊断退行性脑病

Early Diagnosis of Neurodegenerative Diseases in Brain

神经退行性疾病是困扰现代社会的重大脑疾病。以发病率居首位的阿尔茨海默病（俗称老年痴呆症）为例，60 岁以上人群中大约有 5% 的男性和 6% 的女性受累于阿尔茨海默病。并且随着人口老龄化的加剧，受累人群比例仍在快速增加。最低估计中国目前有 500 万患者，相关的医护开支每年达 1000 亿元人民币。另一典型代表是帕金森病，目前有 150 万的美国人罹患帕金森病，这一数字仍以每年 6000 人的速度递增。

神经退行性疾病主要是指一类以神经元退行性病变导致个体以行为异常乃至死亡为主要特征的慢性进行性神经系统疾病，主要包括阿尔茨海默病（Alzheimer's disease，AD）、帕金森病（Parkinson's disease，PD）、亨廷顿病（Huntington's disease）、多聚谷氨酰胺类疾病（polyglutamine disease，PolyQ）等。研究发现，神经退行性疾病是由多种不同原因导致的，包括神经元或神经胶质细胞不能提供充分的营养、轴突传递功能受损、谷氨酸受体活性过高、活性氧水平过高、代谢通路受损、线粒体能量产生减少、错误折叠的蛋白质形成增加或降解不充分、炎症过程、病毒感染、细胞核或线粒体 DNA 突变，以及 RNA 或蛋白质的加工过程不正确所致的特殊蛋白质或脂质部分功能的损失或增加等因素。虽然诱发这些疾病的病因和病变部位不尽相同，但它们都有一个共同的特征，即发生神经元的退行性病变和凋亡，并最终导致个体死亡。

由于缺乏有效的方法和手段，对神经退行性疾病的治疗一直停滞不前，目前也没有任何药物能治愈神经退行性疾病，一些药物仅能在某种程度上减轻症状，且长期使用具有毒副作用。而早期干预则可延迟疾病的发生、延缓病程的进展。因此，早期诊断神经退行性疾病显得尤为重要。本文以阿尔茨海默病的早期诊断为例，介绍目前的进展和存在的问题。

阿尔茨海默病的主要临床表现为进行性智力衰退，其中记忆力丧失较为突出，同时判断力、思维定向能力降低，可伴有表情淡漠、人格行为改变、嫉妒妄想、性格孤僻、激动易怒、缺乏耻辱和道德感、不注意卫生、以自我为中心、自私、举动反常等行为学改变。其患者大多在 60 岁左右发病，由发病至死亡平均病程 3～7 年，少数患者发病后可存活 10 年或更长时间。其早期表现常比较隐匿，初期症状极不典型，容易被忽视。对阿尔茨海默病诊断时应首先做出痴呆的

诊断，确定是否存在可能的痴呆，在排除其他原因引起的痴呆后，再进一步做出阿尔茨海默病的诊断。临床上，阿尔茨海默病的诊断主要是根据患者的认知功能状态，结合神经病学检查，在排除其他引起痴呆的原因后做出的排除性诊断。目前，只能做出“临床上可能的阿尔茨海默病”的诊断。只有在患者去世后，通过脑的病理解剖检查才能确诊阿尔茨海默病。脑的病理解剖仍然是阿尔茨海默病诊断的金标准，它是根据阿尔茨海默病的主要病理特征而判断的。阿尔茨海默病的主要病理特征为脑内形成大量 Aβ 蛋白组成的老年斑和过度磷酸化的 tau 蛋白组成的神经原纤维缠结。主要方法是利用银化合物、刚果红等染料对患者脑组织中的老年斑和神经原纤维缠结进行染色，在显微镜下观察，根据其数量多少诊断阿尔茨海默病。

近年来，对阿尔茨海默病的早期诊断所取得的主要进展包括基因学检查、认知功能评估、影像学检查及可能的生物学标志物检测等。

载脂蛋白 E4（Apo E4）基因是目前最明确的散发性阿尔茨海默病发病的风险因子，它显著增加发生阿尔茨海默病的危险性。Apo E4 位点对轻度认知功能损害的诊断和阿尔茨海默病的早期诊断极有帮助。多项研究显示，Apo E4 基因携带者的轻度认知功能损害患者易进展为阿尔茨海默病，Apo E4 基因型是轻度认知功能损害转化为阿尔茨海默病的最佳预测因素。因此，对 Apo E4 基因型的检查对早期诊断阿尔茨海默病有着重要价值。

由于阿尔茨海默病的主要病理特征为 Aβ 蛋白和 tau 蛋白的大量聚集，故对脑脊液（CSF）中的 Aβ 和 tau 蛋白水平检测有重要意义。大多研究显示，早期阿尔茨海默病脑脊液中 tau 蛋白水平增加，并保持稳定，而脑脊液中 Aβ1～42 水平早期升高，随病情进展下降。结合脑脊液中 tau 蛋白和 Aβ1～42 水平检测有助于提高轻度认知功能损害早期诊断并判断其向阿尔茨海默病的转化，可提高阿尔茨海默病早期诊断的敏感性和特异性。

采用影像技术诊断阿尔茨海默病是新发展起来的方法，临床常用的影像手段有计算机断面成像（CT）、磁共振成像（MRI）、单光子发射计算机断面成像（SPECT）和正电子发射成像（PET）。CT 和 MRI 主要显示阿尔茨海默病患者的脑结构，可检出脑萎缩和脑结构方面的损害，例如内嗅区、海马体积，有助于以排除法诊断阿尔茨海默病，但在早期诊断方面意义不大。SPECT 脑灌注显像和 PET 脑功能代谢显像对诊断阿尔茨海默病有一定的效果，但部分中度阿尔茨海默病患者在 SPECT 脑灌注显像中没有异常表现。利用 SPECT 或 PET 测定脑血流和脑代谢功能的变化，并根据病灶部位的不同在一定程度上可区分不同类型的痴呆，也可通过测定脑中乙酰胆碱酯酶的活性变化诊断阿尔茨海默病。但到目前为止，这些 SPECT 和 PET 方法还无法建立一套完整统一的诊断标准，使其无法在临床上得以应用。以阿尔茨海默病病理特征——老年斑为生物学标志物，

制备亲老年斑的放射性分子探针，利用 PET 和 SPECT 技术进行显像测定 Aβ沉积的位置和数量，可早期非侵害性地诊断阿尔茨海默病。核医学放射性核素示踪技术具有无创、安全和早期检测组织器官血流、功能代谢和受体密度等变化的独特优势。SPECT 和 PET 对血流、代谢和受体的显像是目前公认的早期诊断阿尔茨海默病的方法。

必须强调，目前尚无有效手段、测试方法和单一指标可肯定地对阿尔茨海默病做出早期诊断，故需采取多项指标以协助早期诊断。综合多种诊断标准及相关临床检查，可显著提高临床诊断的正确率。

在阿尔茨海默病的早期临床诊断方面，最大的进展在于提出了轻度认知功能障碍（mild cognition impairment，MCI）的概念。目前认为轻度认知功能障碍是介于正常衰老和阿尔茨海默病之间的一种过渡状态，其中一部分患者可能发展为阿尔茨海默病。有专家预测：MCI 的早期诊断和早期干预将是阿尔茨海默病研究中最可能首先取得突破的领域。

参 考 文 献

Hardy J, Selkoe DJ. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. Science, 297: 353～356

Klunk WE, Engler H. 2004. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. Ann Neurol, 55: 306～319

Ono M. 2009. Development of positron-emission tomography/single-photon emission computed tomography imaging probes for in vivo detection of beta-amyloid plaques in Alzheimer's brains. Chem Pharm Bull, 57: 1029～1039

撰稿人：周江宁
中国科学技术大学

视觉障碍的发生机制

The Mechanism of Vision Disorders

视觉障碍（disorder）是涉及临床眼科学和脑功能科学的一类复杂问题。视觉的形成始于眼部，人类眼球的精细光学和视网膜神经结构使得外界信息最大限度地通过眼部的光学系统精确成像和视路神经系统的光电转换传递至大脑，经过视皮质对视觉信息加工、解释，最终形成包括形觉、光觉、色觉等功能的视觉认知（cognition）。视皮质在没有正常的外界信息输入时需要对有缺陷的外界信息进行加工，重新解释并最终形成受损状态下的视觉认知，这种受损的视觉认知即表现为临床行为上的视觉障碍。视觉障碍广义的是指低于正常视觉功能的一切视觉现象，狭义的则是指达到世界卫生组织定义的低视力和盲目程度。就目前医学科学和生命科学所能够识别的绝大多数视觉障碍是：眼部及神经疾病对眼部光学系统或者视网膜组织及视神经通路系统的损害使得外界信息不能有效传递至视觉中枢所致视觉感知觉损害。至于由大脑认知异常造成的视觉障碍则是另一领域。

视觉器官的光学系统损害造成的视觉障碍可以通过有效的手段来去除并重新建立，达到复明或者提高视觉成像质量的目的。然而临床上视觉神经系统病变导致的视觉障碍往往是不可逆转的，据估计在发达国家一半以上的失明是由视网膜视神经病变引起的。病理上明确是视网膜神经组织相应的细胞变性损害、丧失造成的常见致盲性眼病有青光眼（主要是视网膜神经节细胞）、视网膜色素变性（主要是视杆细胞）、黄斑变性（主要是视锥细胞）等。问题是在这些疾病状况下其神经细胞的消亡目前是不能够修复的。医学科学家为治疗这些疾病尝试了多种疗法如药物、手术、激光、光化学、基因等，但仍然没有突破性进展。针对这些神经性损害疾病，正在开展的视网膜神经再生修复及人工视觉假体（visual prosthesis）仿生替代的研究，显示出将改变神经性致盲不可逆的预后前景。

目前解决视网膜视神经性致盲性眼病的策略之一是视网膜视神经的再生，途径有两种：一是通过各种方法诱导患眼自身的视网膜干细胞分化修复已经丧失或严重损害的视网膜各种神经细胞；二是通过各种来源的细胞在体外诱导培养视网膜干细胞，然后通过微创性视网膜手术将这些修复性细胞移植或种植于眼内，以替代丧失或严重损害了的视网膜视神经组织。前者最大的特点是利用自身的眼部视网膜干细胞来分化修复，存在的问题是这类位于视网膜与睫状体边缘区的干细胞数量非常有限，在活体上如何进行有效的诱导分化以及足够量的修复也是一个

难题。后者可以克服前者的局限，通过患者自体的诸多组织细胞来源在特定条件下诱导为视网膜干细胞，达到足够数量后再移植入病患的视网膜组织中来进行修复和重建。解决这个难题除了干细胞移植分化相关的共性问题外，关键的是涉及修复过程中视网膜视神经组织结构的重塑问题，即在视网膜组织中诱导分化形成的各种神经细胞如何与宿主的病损视网膜视神经组织形成有效的神经网络及视觉信息的交流整合？

解决神经性盲这类视觉障碍的另一手段是用仿生的人工视觉假体替代。人工视觉假体就是在视觉通路的不同部位植入设计的电子芯片，由它接收外界光信号后转换成电信号，刺激视觉系统神经细胞来激活视觉网络通路，最后将信号传入视皮质中枢整合成图像，从而使失明的患者获得部分有用视力的人工植入物装置。根据植入部位假体分为视网膜型（俗称视网膜芯片）、视神经型和视皮质型，其中视网膜型假体的研究最为活跃和深入，包括视网膜前型和视网膜下型。早在1956年就已经开始了人工视觉的研究，随着计算机技术的兴起，20世纪80年代末美国、德国、日本等发达国家的多个研究小组致力于人工视觉及其视觉假体的研究。近年来的科技发展，尤其是眼科显微手术技术的不断完善，超大规模集成电路微电子技术、微机械、微加工等相关领域技术的发展，在材料、信息、工程、生物及临床医学等多学科联袂合作下该领域的研究取得了可喜的进展，但距离临床应用还有不少的科学问题需要攻克。其中最为关键的是人工视觉假体所获得的信息如何准确地与接受植入患者原来的视觉神经系统整合，以及如何对整合后得到的信息进行视觉再认知？

当眼科疾病剥夺了患者的绝大部分外界视觉信息后，其整个视觉系统尤其是视路、视皮质也发生了相应的突触后变化。因此如果要重建视觉功能，首先要研究这些眼病造成输入视觉信息改变后可能出现的视觉认知神经系统适应性变化以及视觉剥夺后的跨皮质重塑，也就是当视觉信息传入几乎完全被剥夺之后，患者需要更多地依赖其他感知觉系统如听觉、触觉等来保持与外界信息的联系，与此同时视皮质也开始对其他感知觉系统的信息产生反应，即视皮质跨感知觉重塑。此外，初级视皮质神经元相互之间保留了视网膜视野的毗邻关系（视网膜拓扑投射），视网膜或视神经层面的神经再生修复或人工视觉假体如何建立这种神经元之间的复杂突触联系，也需要得到研究解决。

视网膜和视神经是活体上唯一能够直接观察到的神经组织。近年来的研究发现，可以通过光学自适应（adaptive optic）系统和高光谱系统在显微结构上来识别活体眼视网膜神经细胞的形态与功能状况。通过脑功能成像技术能够在活体观察大脑视觉通路和视皮质对不同视觉信号刺激的活动反应。这些非创伤性的结构与功能相结合的研究手段极大地丰富了传统的光镜、电镜、免疫荧光等形态学观察，以及视觉电生理和视觉功能的心理物理学检测。因此，未来的方向是加强以

视觉感知为主的临床眼科学与以神经科学为基础的大脑视觉认知的系统研究，很有可能突破对视觉障碍发生机制的认识，可望解决神经眼科领域有关不可逆性视觉障碍疾病的难题。

参考文献

Baker CI, Peli E, Knouf N, et al. 2005. Reorganization of visual processing in macular degeneration. J Neurosci, 25: 614～618

Cheung SH, Fang F, He S, et al. 2009. Retinotopically specific reorganization of visual cortex for tactile pattern recognition. Curr Biol, 19: 596～601

He S, Cavanagh P, Intriligator J. 1996. Attentional resolution and the locus of visual awareness. Nature, 383: 334～337

Levi DM. 2008. Crowding—an essential bottleneck for object recognition: a mini-review. Vision Research, 48: 635～654

Wandell BA, Smirnakis SM. 2009. Plasticity and stability of visual field maps in adult primary visual cortex. Nature Reviews Neuroscience, 10: 873～884

撰稿人：孙兴怀

复旦大学附属眼耳鼻喉科医院

离子通道与脑疾病

Ion Channels and Brain Diseases

离子通道（ion channel）是细胞膜上的一类特殊蛋白质微孔道，开放时能使特定离子跨膜转运。离子通道广泛存在于从细菌到人类的生物界，是许多基本生命活动如电活动、离子转运和细胞分泌等的基础。离子通道种类繁多，根据所能通过的离子类型，可将离子通道称为某种离子通道（如 Ca^{2+}、K^{+}、Na^{+} 通道等）；也可按其门控（gating）被调节的机制分为电压门控离子通道（voltage gated ion channel，VGIC）及配体门控型离子通道（ligand gated ion channel，LGIC）。根据国际药理学联合会数据库（IUPHAR）的统计，目前发现的人类离子通道基因至少有 209 种，包括 141 种 VGIC 和 68 种 LGIC。

离子通道是神经系统功能活动的基础，是神经元电活动和神经突触传递的必要条件。离子通道功能异常可导致神经系统疾病。其中最能说明离子通道重要性的例子是由离子通道基因突变导致的、可以遗传的、被称为离子通道病（channelopathy）的神经系统疾病。目前所知涉及神经系统的离子通道病包括：①癫痫（epilepsy）；②偏头痛（migraine）；③运动障碍（如小脑共济失调，cerebella atxia）；④精神和认知障碍；⑤外周神经及自主神经系统障碍等。目前，在近 30 种的不同离子通道中发现了可以导致上述离子通道病的基因突变。

多数离子通道突变导致的神经系统疾病具有阵发性发作特征。虽然发病率较低，由单基因突变导致的离子通道病为研究神经系统疾病发病机制提供了重要的机会。无明显遗传史的原发性癫痫和偏头痛等都是临床常见的、对患者身心健康及患者家庭及社会造成严重影响的疑难疾病。目前的治疗效果无论是药物治疗还是其他措施都不令人满意。其根本原因是对这些疾病的发病机制，尤其是分子机制缺乏足够的了解。由于这些疾病的临床表现特征与相类似的离子通道病的临床表现特征相似，因此借助对发病原因明确的离子通道病的了解，可大大促进我们对相关脑疾病发病机制的了解及研发新的治疗措施。例如，基因突变导致的 KCNQ2/3 钾离子通道功能降低可导致癫痫，提示 KCNQ 钾离子通道功能在维持中枢神经系统兴奋性方面起重要作用。在此基础上开发的 KCNQ2/3 钾离子通道特异性开放剂 retigabine 则具有治疗癫痫作用，并已通过Ⅲ期临床试验，将成为第一个通过开放钾离子通道的机制治疗癫痫的创新性药物。这一成功事例为其他脑疾病发病机制和新治疗措施研究展示了令人振奋的希望，同时也提示在脑疾病研

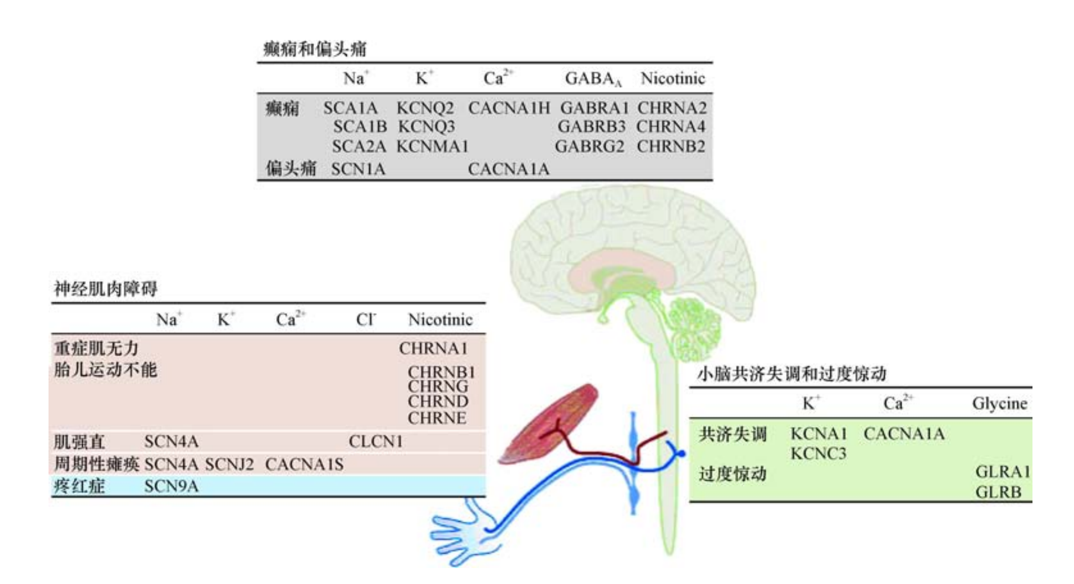


图 1　引起神经系统离子通道病的基因离子通道类型及疾病名称

修改自 Kullmann KM. 2010. Annu Rev Neurosci

究中对于关键功能蛋白的了解和蛋白功能调节剂的研发至关重要。以上述 KCNQ2/3钾离子通道为例，经过多年研究，发现以 KCNQ2/3 为分子基础的 M 型钾电流在中枢神经元的兴奋性中发挥三方面的作用：①减少神经元的重复性放电（repetitive firing），包括缩短动作电位时程及减少放电频率；②减少由于后除极（afterdepolarization）诱发的簇性（burst）放电；③控制动作电位域值，减少自发性放电。M/KCNQ 通道的上述作用是由其所固有的电生理学特征所决定的，其主要电生理特征包括：①在神经元静息膜电位下是开放的；②激活缓慢，不失活，去活缓慢。M/KCNQ 钾通道开放剂的研究始于 flupirtine（氟吡汀）。氟吡汀作为镇痛药在临床使用已有 20 年的历史，之前并不知道它有开放 M/KCNQ 通道的作用，后来发现它有抗惊厥的作用，对此的进一步扩展研究发现了具有不同寻常的抗癫痫作用的 retigabine。随后的研究表明，retigabine 和氟吡汀都是 M/KCNQ 通道开放剂。除癫痫外，对 retigabine 潜在的临床应用研究已扩展到偏头痛、焦虑、躁狂、精神依赖性药品成瘾等诸多方面。然而，这并不代表 M/KCNQ 通道功能异常在这些疾病中发挥了重要作用，而是由于此类钾通道在中枢神经系统的广泛表达使其在被激活开放时能对中枢神经元整体兴奋性产生抑制作用。因此，虽然很少有原发性癫痫是由 M/KCNQ 通道功能异常所致，retigabine 仍然可以通过两个方面的作用抑制任何起源的癫痫发作。两个方面的作用包括：①通过使 M/KCNQ 通道在更负的膜电位下激活进而增加静息膜电导，促进膜电位超极化，进而降低兴奋性；②增强的 M/KCNQ 功能抑制重复放

电。因此，对相关离子通道（蛋白）功能特征和调节机制、细胞组织分布，以及相关功能调节剂的研究是脑病研究的重要手段之一。

然而，离子通道与脑疾病的关系仍有许多难题。例如，离子通道的点突变为什么可放大为神经、精神疾病？其分子、细胞和环路机制是什么？多种离子通道病都可表现为同样的临床症状，如多种钠通道、钾通道基因突变都可导致表现相似的癫痫，其机制是什么？离子通道病的发病机制与相关的原发性脑疾病的差别在什么地方？即使是病因不清的许多原发性脑病，离子通道的功能改变也可能在其中发挥了重要作用。问题是我们不知道是哪些通道发生了什么样的改变，以及这些改变因何影响了正常脑功能。这些均是有待研究的重要问题。

参 考 文 献

Ashcroft FM. 2000. Ion Channels and Diseases. San Diego: Academic Press

Brown DA, Passmore GM. 2009. Neural KCNQ (Kv7) channels. Br J Pharmacol, 156: 1185～1195

Fukata Y, Adesnik H, Iwanaga T, et al. 2006. Epilepsy-related ligand/receptor complex LGI1 and ADAM22 regulate synaptic transmission. Science, 313: 1792～1795

Hibino H, Inanobe A, Furutani K, et al. 2010. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. Physiol Rev, 90(1): 291～366

Hille B. 2001. Ion Channels of Excitable Membrane. 3rd ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc

Kullmann KM. 2010. Neurological channelopathies. Annu Rev Neurosci, 33: 151～172

Porter RJ, Partiot A, Sachdeo R, et al. 2007. Randomized, multicenter, dose-ranging trial of retigabine for partial-onset seizures. Neurology, 68(15): 1197～1204

Suzuki T, Delgado-Escueta AV, Aguan K, et al. 2004. Mutations in EFHC1 cause juvenile myoclonic epilepsy. Nat Gene, 36: 842～849

撰稿人：张海林

河北医科大学

脑肿瘤的产生机制

Tumorigenesis in the Brain

脑肿瘤是由脑内的细胞发生失去控制的异常增殖所导致。与我国一些高发病率的肿瘤（如乳腺癌、肺癌、胃癌、肝癌等）相比，脑肿瘤属于发病率较低的肿瘤，约占全身肿瘤的 2%，但儿童脑肿瘤相对较常见，其发病率和致死率均仅次于白血病位居第二。

脑肿瘤主要可分为神经上皮性肿瘤、脑膜瘤、神经鞘瘤、神经纤维瘤、脑血管瘤、垂体瘤、脑淋巴瘤和转移瘤，其中以神经上皮性肿瘤在所有脑肿瘤中占的比例最高。由于脑肿瘤细胞的增殖和浸润能力较强，而且往往具有很高的耐药性，导致脑肿瘤复发率较高。恶性神经上皮性肿瘤患者的生存期非常短，例如多型性胶质母细胞瘤患者的生存期一般不超过 12 个月。缺乏对脑肿瘤产生机制的认识制约了其治疗。

肿瘤的产生机制是由于机体自身细胞的遗传物质发生变异，使细胞获得了不受控制的无限增殖的能力。脑肿瘤的产生机制也不例外，例如神经上皮性肿瘤为神经上皮细胞（包括胶质细胞、神经元、室管膜细胞等）的遗传物质发生变异而产生的肿瘤。绝大多数细胞遗传物质的变异都不会引起表型的改变，但当某些关键基因（例如原癌基因和抑癌基因）发生变异，并且当这些关键基因的变异积累到一定程度时正常细胞就会演变为肿瘤细胞。脑肿瘤的产生也是多基因变化协同作用的结果。

脑肿瘤发生过程中涉及的关键基因包括：表皮生长因子（EGF）受体、血小板衍生的生长因子（PDGF）受体等原癌基因；p53、PTEN（phosphatase and tensin homolog）、p16 等抑癌基因。这些基因产物大都参与调控细胞增殖、凋亡和存活等关键信号通路。它们的变异使正常细胞变成具有无限增殖、抗凋亡、基因组不稳定等特征的肿瘤细胞。

人们对神经上皮性肿瘤的发生机制研究得很多。以神经上皮性肿瘤中非常普遍的胶质细胞瘤为例，通过病例研究，人们发现在不同恶性等级的胶质细胞瘤中基因的变异通常具有一定的规律性。在低等级的胶质细胞瘤中最常见的变异包括 PDGF 受体及其配体的过量表达和 p53 的失活，这些变异使得细胞拥有过度的增殖能力和基因组的不稳定性。在继发性高等级的胶质细胞瘤（从低等级肿瘤演变成为的高等级肿瘤）除了以上基因变异外，通常还发生了周期素依赖的激酶 4

（CDK4）的过量表达以及 p16、Rb 和 PTEN 的缺失等其他变异，这些变异进一步提高了细胞的增殖能力并且使细胞具有了抗凋亡能力。与继发性肿瘤不同的是，在原发性高等级胶质细胞瘤（发现时即为高等级肿瘤）中通常发生的是 EGF 受体的过量表达和持续激活型突变、PTEN 和 p16 的缺失等变异。这些已知的基因变异的现象提示众多基因变异的积累诱导胶质细胞瘤产生并加剧其恶性程度，同时也显示出脑肿瘤产生机制的复杂性（图 1）。

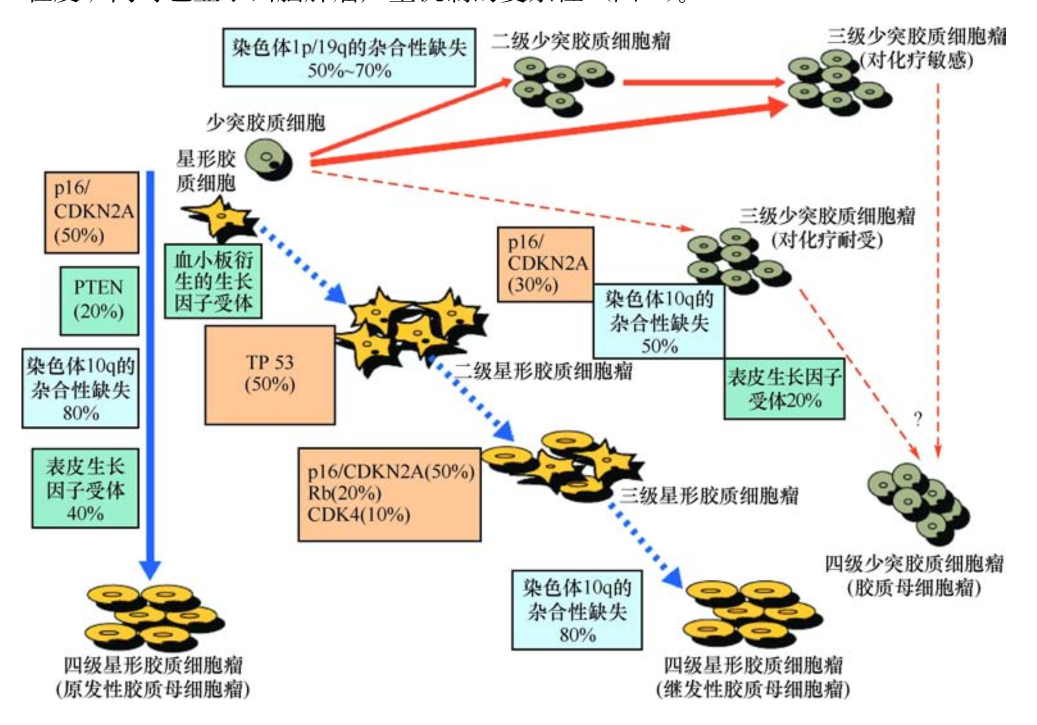


图 1　胶质细胞瘤发生过程中涉及的基因变异及其积累过程

蓝色虚线指明由正常星形胶质细胞不断恶化而形成胶质母细胞瘤的过程；蓝色实线指明原发性胶质母细胞瘤的发生过程；橙色线条指明由正常的少突胶质细胞演变为少突胶质细胞瘤的过程，目前仅了解第 1 号染色体短臂（1p）和第 19 号染色体长臂（19q）上的杂合性缺失与之相关，但具体机制有待研究

以上这些在病例中发现的胶质细胞瘤基因变异的规律为脑肿瘤的产生机制提供了间接证据。为了找到脑肿瘤产生机制的直接证据，人们利用转基因小鼠或基因敲除小鼠模型，试图模拟胶质细胞瘤在体的发生过程。2000 年前后，Eric Holland 与其同事利用神经前体细胞特异启动子——nestin 基因的启动子驱动周期素依赖的激酶 4 和持续激活型 EGF 受体在神经前体细胞中过量表达。他们发现在野生型小鼠中表达这两个基因诱导胶质细胞瘤发生的几率很低，而在 p16 或 p53 缺失杂合体的小鼠中表达这两个基因诱导胶质细胞瘤发生的几率大大提高。类似的研究也发现在神经前体细胞中单独表达持续激活型 Ras 或持续激活型 Akt

都不能够诱导肿瘤，只有当两者同时表达时才能有效诱导肿瘤。这些研究结果提示多个基因发生变异，并且当变异发生恰当组合的情况下，才有较大几率诱发胶质细胞瘤，这些结果也为脑肿瘤的产生机制提供了直接的实验证据。

近年来，肿瘤干细胞概念为脑肿瘤产生机制提供了新的解释。Peter Dirks及其同事于2004年在脑肿瘤患者的肿瘤组织中分离并鉴定了脑肿瘤干细胞。脑肿瘤干细胞是分布在脑肿瘤组织中的一小部分具有分化、增殖和自我更新等干细胞特性的细胞，它比普通脑肿瘤细胞具有更强的成瘤能力，而且对放化疗更加耐受。上文中提到的两种胶质瘤动物模型都是在神经前体细胞（脑肿瘤干细胞可能来源于此类细胞）中诱导产生的肿瘤，提示脑肿瘤干细胞在胶质瘤成瘤过程中的重要作用。脑肿瘤干细胞的发现为认识和治疗脑肿瘤提供了新的方向，传统关于肿瘤形成和发展的观点认为每一个肿瘤细胞理论上都具有单独形成肿瘤的能力（随机模型），而肿瘤干细胞假说认为肿瘤中仅有一小部分细胞即肿瘤干细胞赋予了肿瘤无限生长的能力，只有肿瘤干细胞才能单独形成肿瘤（等级模型）（图2）。这种假说得到目前许多实验的支持。在临床前实验中特异针对脑肿瘤干细胞的化疗药物能起到比针对普遍肿瘤细胞更好的抑制肿瘤生长的作用。但目前关于脑肿瘤干细胞仍有许多未知的问题。例如，脑肿瘤是否的确产生于脑肿瘤干细胞还没有直接的实验证据支持；另外，对脑肿瘤干细胞是由什么细胞发生变异而产生的还没有定论，成熟的胶质细胞、神经前体细胞和成体神经干细胞都被推测有可能是脑肿瘤干细胞的来源。

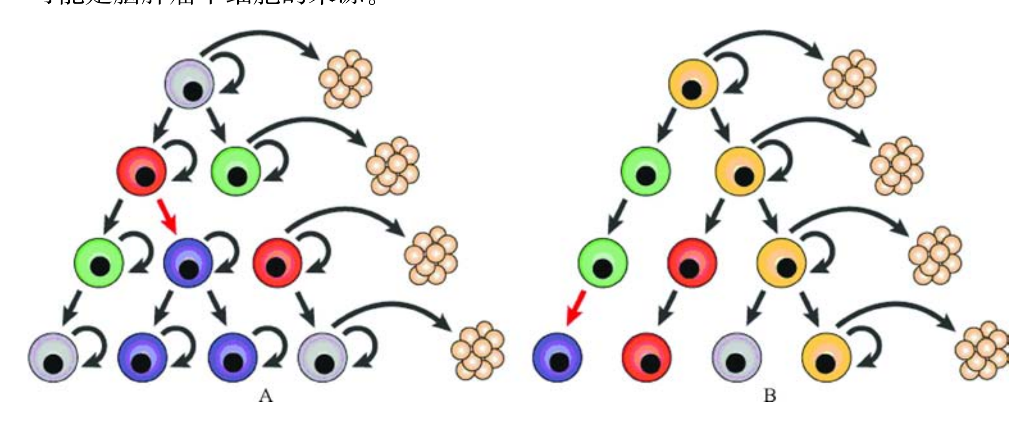


图2　肿瘤产生的随机模型（A）和等级模型（B）

随机模型认为每个肿瘤细胞都有单独形成肿瘤的能力；等级模型认为只有肿瘤干细胞（黄色标注的细胞）具有单独形成肿瘤的能力

以上谈到的肿瘤细胞基因变异的规律和脑肿瘤干细胞概念是目前人们对脑肿瘤产生机制的认识。由于脑肿瘤类型多样、细胞来源复杂，对其产生机制的全面了解还存在很大困难。解决这个困难很大程度上依赖于更加精细的动物模型，以

模拟在不同类型细胞中肿瘤的发生过程。利用含有各种细胞特异的启动子的转基因或基因敲除小鼠，能实现在脑内特定细胞中的基因过表达或基因敲除，从而观察哪些基因的变异能导致脑肿瘤的发生。另外，上文中提到脑肿瘤的产生是众多基因变异积累和组合的结果，那么在了解了哪些基因发生了变异的基础上，深入分析这些基因变异的组合规律成为当务之急。目前，通过对尽可能多的脑肿瘤样本进行大规模的整合基因组分析能找到更多脑肿瘤相关基因，并且能找到细胞内信号通路突变的规律性。自 2006 年以来，由美国国家癌症研究所和国家人类基因组研究所倡导的、多个研究机构共同完成的癌症基因组图谱在此方面迈出了领先的一步。

参考文献

Behin A , Hoang-Xuan K , Carpentier AF ,et al. 2003. Primary brain tumours in adults. Lancet , 361(9354):323～331

DeAngelis LM. 2001. Brain tumors. N Engl J Med ,344(2):114～123

Holland EC , Celestino J , Dai C ,et al. 2000. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. Nat Genet ,25(1):55～57

Holland EC , Hively WP , DePinho RA ,et al. 1998. A constitutively active epidermal growth factor receptor cooperates with disruption of G1 cell-cycle arrest pathways to induce glioma-like lesions in mice. Genes Dev ,12(23):3675～3685

Jemal A , Siegel R , Ward E ,et al. 2009. Cancer statistics , 2009. CA Cancer J Clin ,59(4):225～249

Singh SK , Hawkins C , Clarke ID ,et al. 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. Nature ,432(7015):396～401

Vescovi AL , Galli R , Reynolds BA. 2006. Brain tumour stem cells. Nat Rev Cancer ,6(6):425～436

撰稿人:王以政　丁　夏

中国科学院上海生命科学研究院

自噬与神经退行性疾病

Autophagy and Neurodegenerative Diseases

1. 背景

自噬是细胞内物质成分利用溶酶体降解过程的统称，它是真核细胞所特有的。早在 1962 年，Ashford 和 Porter 就提出细胞中存在“自食”（self-eating），Christian de Duve 将这一现象命名为“自噬”（autophagy）。长期以来，自噬被认为只是细胞降解胞内物质的一种正常生理过程，并没有引起人们的广泛关注。但是，近年来在酵母中发现了自噬的分子机制，随后在哺乳动物细胞中也发现了相似的机制，发现自噬不仅是细胞内物质降解再循环的过程，也是细胞应对内外环境变化的重要机制，广泛参与细胞的生理和病理活动，使得自噬成为生命科学研究的热点之一。

根据细胞内底物运送到溶酶体腔方式的不同，哺乳动物细胞内的自噬可分为三种主要方式（图 1）：巨自噬（macroautophagy）、微自噬（microautophagy）和分子伴侣介导的自噬（chaperone-mediated autophagy，CMA）。巨自噬是自噬发生的最普遍的形式，它首先形成一个包含细胞质的双层膜囊泡（即自噬体），然后自噬体靶向到达溶酶体或液泡，其外层膜与它们的膜融合，释放内部的单层膜囊泡（即自噬小体）进入溶酶体或液泡内发生降解。微自噬是特征较少的过程，主要是通过溶酶体或液泡的膜内陷来分隔一小部分细胞质，最终进入溶酶体或液泡内发生降解，此过程中细胞物质在溶酶体或液泡的表面直接被摄取。CMA 与巨自噬和微自噬不同，它并不发生囊泡转运，胞质内的某些特定蛋白先被一个分子伴侣复合物识别，再与溶酶体上的受体即溶酶体相关膜蛋白（lysosome-associated membrane protein-2，lamp-2）结合，转运至溶酶体内。CMA 的底物是可溶性的蛋白质分子，因此 CMA 降解途径在清除蛋白质时有选择性，而前两者无明显的选择性。

2. 科学意义

神经退行性疾病的主要病理特征是神经元大量过早死亡，这些疾病中往往有异常折叠蛋白的积聚，这些异常折叠蛋白是有基因突变或氧化应激造成的。阐明神经元死亡机制是了解神经退行性疾病发病机制和寻找有效治疗方法的关键。以往 20 多年中对于细胞凋亡（Ⅰ型程序性细胞死亡，PCD-Ⅰ）的研究大大地提高了我们对神经退行性疾病的认识。目前自噬与神经退行性疾病发病的关系正在受

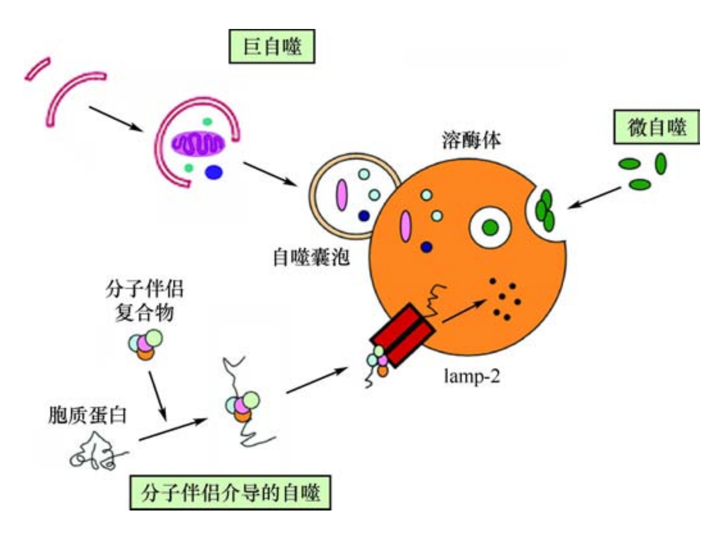


图 1 自噬的三种主要方式

到科学界的重视，成为神经科学中一个重要的研究课题。自噬的两大作用使其在神经退行性疾病中可能有极其重要的影响：①自噬参与清除与神经退行性疾病相关的异常折叠蛋白（如阿尔茨海默病中的 β-amyloid、帕金森病中的 α-synuclein、亨廷顿舞蹈病中的 Huntingtin、神经海绵状变的 prion 蛋白）；②诱导自噬性细胞死亡（Ⅱ型细胞程序性死亡，PCD-Ⅱ）。

3. 最新进展

近年来的许多研究表明，自噬体增多在阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿舞蹈病、神经海绵状变（prion 病）患者以及在脑卒中和神经兴奋性毒性的动物模型中发现。但是自噬在这些疾病致病中的作用有待阐明，是神经科学亟待研究和解决的重要课题。

细胞内蛋白质异常积聚和蛋白质降解系统的改变是一些神经退行性疾病受累神经元的共同特点，有人把这类神经系统疾病称为蛋白质折叠异常病（protein misfolding disease）。细胞内异常折叠蛋白积聚的主要原因有基因突变或氧化应激造成蛋白质空间结构改变、细胞内蛋白质降解系统失常。细胞内物质的降解主要遵循两种途径，一种通过蛋白酶体，另一种是通过自噬。蛋白酶体主要降解胞内的短寿命蛋白，而自噬则负责长寿命蛋白和一些细胞器的降解。当蛋白质因折叠异常而发生聚集后，进入蛋白酶体酶解部位困难而使其降解减慢。这时自噬就成了降解异常折叠蛋白的主要角色。从这个层面看，增加自噬活性对神经元清除异常蛋白质的积聚是有益的，一些靶向自噬的药物已经开始在疾病动物模型中进行研究。

4. 主要难点

自噬在神经退行性疾病中的作用及能否成为治疗的靶点目前尚不清楚。自噬在细胞生存中的作用因自噬激活的程度、持续时间和致病因素而异，自噬对细胞有促进生存或促进死亡的双重作用，因此自噬可能是一把双刃剑。目前自噬的研究大部分集中在巨自噬，从巨自噬的发生机制看，巨自噬降解异常折叠蛋白时选择性比较差。在降解异常折叠蛋白的同时会造成细胞质成分和细胞器的消耗。因此长时期过度活跃的自噬对细胞生存的利弊需要研究，自噬压力（autophagic stress）的概念因此已经被学术界提出。

5. 展望

为了阐明自噬与神经退行性疾病的关系，首先要解决的问题是：巨自噬降解异常折叠蛋白时有无识别机制；除巨自噬外，微自噬和分子伴侣介导的自噬在神经退行性疾病中有无参与。为了充分利用自噬的有益作用，理想的办法是增加CMA的活性或提高巨自噬对错误折叠蛋白的选择性。另外还要解决的是：自噬可以使细胞生存能力提高或降低，但是自噬对细胞生存有益或有害作用转换的细胞与分子机制不明。弄清楚自噬对细胞生存双重作用转换的分子机制，对我们利用自噬的有益作用、防止有害作用是非常重要的。这些方面的研究将为许多神经疾病的致病机制和治疗提出新的观点。

参考文献

Cuervo AM, Mann L, Bonten EJ, et al. 2003. Cathepsin a regulates chaperone-mediated autophagy through cleavage of the lysosomal receptor. EMBO J, 22(1): 47～59

Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, et al. 2004. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. Science, 305(5688): 1292～1295

Clausen TH, Lamark T, Isakson P, et al. 2010. p62/SQSTM1 and ALFY interact to facilitate the formation of p62 bodies/ALIS and their degradation by autophagy. Autophagy, 6(3): 330～344

Galluzzi L, Morselli E, Vicencio JM, et al. 2008. Life, death and burial: multifaceted impact of autophagy. Biochem Soc Trans, 36(5): 786～790

Martinez-Vicente M, Cuervo AM. 2007. Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. Lancet Neurol, 6(4): 352～361

Miller S, Tavshanjian B, Oleksy A, et al. 2010. Shaping development of autophagy inhibitors with the structure of the lipid kinase Vps34. Science, 327(5973): 1638～1642

Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. Nature, 451(7182): 1069～1075

Shintani T, Klionsky DJ. 2004. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. Science, 306(5698): 990～995

Wang Y, Han R, Liang ZQ, et al. 2008. An autophagic mechanism is involved in apoptotic death

of rat striatal neurons induced by the non-*N*-methyl-*D*-aspartate receptor agonist kainic acid. Autophagy, 4(2): 214～226

Wen YD, Sheng R, Zhang LS, et al. 2008. Neuronal injury in rat model of permanent focal cerebral ischemia is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways. Autophagy, 4(6): 762～769

撰稿人：秦正红
苏州大学

精神分裂症的临床与神经机制

The Clinical Manifestation and Neural Mechanism of Schizophrenia

个人的精神世界就像是一个大工厂，大脑就是厂房，每个小的脑细胞就是一个工人，每一种精神活动都是这个大工厂里许许多多的工人一起协作生产加工出来的。这个大工厂结构非常复杂，但如果按照生产的产品来区分，大致上可以分成三个车间——思维车间、情感车间和行为车间。通常情况下，这三个工厂都是协调一致的，这构成了我们日常的心理状态。但是突然有一天，这个大工厂遇到了全球型的经济危机，工厂里面本来安心工作的工人都乱成了一团。思维、情感和行为这三个车间之间的工人总是冲突不断，思维朝东走，情感就朝西走，行为干脆朝南走，它们之间再也不好好合作，步调变得紊乱、不协调。此时大脑工厂面临了前所未有的危机，这个危机就叫做精神分裂症。

在医学上，精神分裂症被定义为一组病因未明的精神疾病，具有思维、情感、行为等多方面的障碍，以精神活动和环境不协调为特征。精神分裂症比较常见的症状包括幻觉、妄想、情感淡漠。在一般人群中的患病率约为1%。这种疾病给患者、家庭、社会都带来了较大负担。

就像人得了感冒，会打喷嚏、流鼻涕一样，人得了精神分裂症，同样会出现一些平时没有的感觉，这叫做“阳性症状”。在《美丽心灵》这部获奥斯卡奖的电影中，就讲了一个真实的故事，一个天才数学家平时的好友、好友的侄女都是他自己幻想出来的人物，他还妄想美国军方要求他分析杂志上的密码，幻觉和妄想就是精神分裂症最常见的“阳性症状”。与我们平时的白日梦或者想象不同，这些幻觉中的人物和妄想的事情，对他来说非常真实，他对此深信不疑。这是精神分裂症最难以治疗的一点——对其自身精神状态的认识能力，即能否判断自己有病和精神状态是否正常，即“自省力”，这也是精神分裂症的研究难题之一。

精神分裂症除了会出现平时没有的感觉以外，也会出现缺少正常人应该有的一些表现。例如，我们正常人遇到高兴的事情，心中就会觉得很开心，会笑出来；但精神分裂症患者却很难体验到这种快乐，也不会因此而笑。这种该有的正常表现却没有的症状称为“阴性症状”，不能体验到快乐的症状称为“快感缺乏”，是一种常见的阴性症状。

精神分裂症患者的语言是考察他们临床症状的窗口，同时也是科学家们感兴趣的问题。哲学家保罗·格莱斯（Paul Grice）曾经总结出我们日常谈话的规则：

第一，给出所需要信息；第二，信息不要太多；第三，信息要和主题有关。设想上班高峰你在车站等车的时候问一个不认识的人“现在是什么时间”，以下的答案会帮助你理解违背这些规则的后果：答案一“上午”；答案二“七点四十二分零八秒二”；答案三“这是前门车站”。精神分裂症患者的语言可能出现这些特点。当然这些异常远远不能包括他们语言中可能出现的各种异常。科学家们对此进行了研究，一些研究者给患者看两类句子：一类是正常的，比如“我每天早上喝豆浆”；另一类是不正常的句子，比如“我每天早上喝口袋”。然后记录患者的脑电波，再和正常人的脑电波进行对比。普通人的大脑在看到“口袋”400ms之后就能发现语义冲突；精神分裂症患者明显需要更长的时间来发现这种冲突，一些研究甚至表明患者似乎不能发现这种冲突。通常在右利手人群中，语义加工主要是左脑来完成，虽然也需要右脑的配合；情绪则主要由右脑进行加工。可是几乎所有脑成像的研究都发现在加工语义时精神分裂症患者右脑的激活要高于普通人，即便这些材料完全没有情绪色彩。到现在人们也不能解释为什么精神分裂症患者的右脑在加工没有情绪色彩的语义时比普通人的右脑更加积极。难道他们试图找出其中并不存在的情绪色彩吗?

该有的没有，不该有的总是出现，精神分裂症的症状是怎么产生的，精神分裂症的病因到底是什么，这是科学家们许多年来一直都在探索的难题，至今还未解开，所以精神分裂症现在还是“病因未明”的疾病。心理学家Frith对精神分裂症进行了多年研究，提出了“元表征”的概念来解释精神分裂症特征的神经心理机制。元表征在三个方面都特别重要：对自我目标的意识、对自我意图的意识、对他人意图的意识。如果没有对自我目标的意识，会导致阴性或阳性行为异常；如果没有对自我意图的意识，就会缺乏高水平的自我监控，就会导致对行为的经验异常，如被控制妄想、思维插入、行为贫乏等；如果没有对他人意图的意识，就会导致被害妄想和关系妄想。这一理论能解释一些现象，也得到了一些证据支持，但对这三方面的意识为什么会异常，其背后的脑机制或生理机制没有进行说明。

对精神分裂症产生的原因这个难题，心理学家、神经科学家与精神病学家们对大量的现象和研究进行了总结，归纳了两个主要理论（或假说）：一个是“神经发育假说”，它认为精神分裂症患者早在妊娠早期或中期就出现发育异常，导致在青少年或成年早期神经网络出现病理性活动，最终出现阳性或阴性症状。通俗地说就是精神分裂症这种疾病是因为大脑一开始就没有发育好，这个大脑工厂从一开始的工作流程、原材料选购、管理监督等方面就存在问题，只是当时工厂的规模小，问题还没有暴露出来，到一定时候，外部的经济危机一来，就导致了整个工厂工作的紊乱，就像从最里面开始烂起的苹果，有些疾病比如孤独症就属于神经发育型疾病；另一个是“神经退行假说”，认为疾病是由神经元或其髓鞘

的丧失所致，随着时间的推移而恶化，导致了不可逆转的功能障碍。通俗说就是大脑本来都好好的，生化系统功能由于一些原因发生突变，就是在大脑工厂里面，有一帮工人老得干不动了，就辞职不干了，某部分工作没有人来做，其他工人一看这情况，也不愿干了，本来是一个部门的事，马上就演变成了整个工厂的功能系统的崩溃，就像是放得太久香蕉会烂，有些疾病比如阿尔茨海默病就属于神经退化性疾病。

精神分裂症到底是神经发育性疾病还是神经退行性疾病呢？这是一个难题。精神分裂症兼有这两种理论中所描述的表现，现在有人认为这两种类别的疾病不是相互排斥的，精神分裂症可能既是神经发育性疾病也是神经退行性疾病。但不管精神分裂症的病因如何，早早将可能患病的人从人群中找出来，或者有些人觉得不舒服了，医生也可以根据某些客观的标准进行科学的诊断，都是科学家们迫切想要解决的科学难题。研究表明，精神分裂症是有一定的遗传性的，但精神分裂症患者的下一代不一定就会发病，因此和环境也有一定的关系，现在一般认为精神分裂症是遗传和环境相互作用的结果。虽然精神分裂症患者的一级亲属不一定发病，但在某些测量的指标上仍然和正常人有差别，这些指标被称为“内表型”（endophenotype）。内表型可以是多方面的，如生化的、神经心理的、脑解剖的、脑功能的等。和全球暴发 SARS 的时候一样，医生们用温度计对每个人进行测量，人的体温如果高出一定的范围，就判断存在发热这个症状一样，提醒医生和患者应该加以警觉。内表型就是精神分裂症的体温计。科学家们正在努力从生理、心理、神经解剖学等各个角度寻找这些指标，希望将这些“体温计”纳入到精神分裂症国际通用的诊断标准里面去。这样医生在对复杂精神疾病做诊断时，也有一个客观的指标可以作为参考。另外，虽然精神分裂症和遗传有关，但是具体是什么基因导致了精神分裂症的发生，目前还不清楚。内表型是出于疾病和基因之间的标记，和基因的联系更加紧密，通过内表型来定位精神分裂症的基因有可能为精神分裂症的遗传研究带来希望。

直接对精神分裂症进行研究遇到了一些困难，研究者们也尝试着从其他途径进行研究，比如，精神分裂症早期被称为“早发性痴呆”，虽然精神分裂症不一定都会发展为痴呆，但是和老年化有一定的类似之处。Kirkpatrick 等提出精神分裂症是一种“加速老年化综合征”，这一假设是基于精神分裂症患者死亡率上升的现象提出的，并得到了一些研究证据的支持，如精神分裂症的一些认知缺损（如加工速度和情节记忆）和老年人类似；其他生理异常，如精神分裂症脑发育的异常也和老年人相似（如精神分裂症的额叶结构缺损和老年人相似，脑室变大和代谢降低在老年化和精神分裂症患者中表现类似）；还有在基因表达方面也有相似之处，与正常老年化相关的基因表达和早期精神分裂症的基因表达有显著的重叠，说明精神分裂症发病相当于是把老年化过程提前了，即“加速老年化”。

这说明如果科学家们对老年化过程有了透彻的理解，这将有助于人类对精神分裂症的病因及机制的理解。

总之，当前科学家们都在努力寻找合适的方法应对人类的大脑工厂面临的危机。这个过程中产生了许多的科学难题，例如，精神分裂症到底是如何产生的？阴性与阳性症状是怎么产生的？有什么样的指标可以早些发现精神分裂症，早些开始治疗？必须承认的是，关于人类大脑结构与功能的疾病，我们还所知甚少，需要各个领域的科学家们通力合作，“路漫漫其修远兮，吾将上下而求索”。我们相信通过不同学科科学家的努力，一定可以破解精神分裂症的这些难题，给患者和社会带来福音。

参考文献

沈渔邨. 2005,精神病学. 第4版. 北京：人民卫生出版社

Amador X,David A. 2004. Insight and Psychosis: Awareness of Illness in Schizophrenia and Related Disorders. Oxford:Oxford University Press

Frith CD. 1992. The Cognitive Neuropsychology of Schizophrenia. Hove, UK: Lawrence Erlbaum Associates Ltd.

Gard DE, Kring AM, Gard MG,et al. 2007. Anhedonia in schizophrenia:distinctions between anticipatory and consummatory pleasure. Schizophr Res,93: 253～260

Gottesman II,Gould TD. 2003. The endophenotype concept in psychiatry:etymology and strategic intentions. Am J Psychiatry, 160: 636～645

Gupta S. and Kulhara P. 2010. What is schizophrenia:a neurodevelopemental or neurodegenerative disorder or a combination of both? A critical analysis. Indian Journal of Psychiatry,52: 21～27

Hyman SE. 2007. Can neuroscience be integrated into the DSM-V? Nat Rev Neurosci,8:725～732

Kirkpatrick B, Messias E, Harvey PD,et al. 2008. Is schizophrenia a syndrome of accelerated aging? Schizophr Bull,34: 1024～1032

Lewis DA,Levitt P. 2002. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. Annu Rev Neurosci, 25:409～432

van Os J, Rutten BP,Poulton R. 2008. Gene-environment interactions in schizophrenia:review of epidemiological findings and future directions. Schizophr Bull,34:1066～1082

撰稿人:陈楚侨
中国科学院心理研究所

神经系统疾病的非人灵长类转基因动物模型

Transgenic Models of Nervous System Diseases in Non-human Primate

通过遗传工程技术、构建转基因动物是研究人类基因功能的必要途径。转基因技术问世以来，大大推动了现代生物学和医学的发展。由于转基因技术对揭示基因的功能、研究疾病的机制及其新药开发的重大贡献，研究开发小鼠转基因工作的三位科学家因此荣获了 2007 年度的诺贝尔生理学/医学奖。然而，目前遗传工程学的研究主要以果蝇、斑马鱼和小鼠为对象，虽然小鼠的遗传工程技术已经非常成熟，但在认知行为、脑功能和脑疾病研究领域因其先天性缺陷而不能如实反映人类的工作机制和疾病的发生机制。

在系统发生上与人更为接近的高等非人灵长类动物无疑是最合适的实验动物模型。相对于啮齿类的动物，转基因猴的构建工作要困难得多。首先，在生殖生理上，猴为有月经的单胎动物，每个月经周期正常仅有一个优势卵泡发育排卵，不能通过超数排卵直接获得足够数量的胚胎。虽然超数排卵后可以获得一定数量的卵母细胞，但要得到足够数量的胚胎进行体外的转基因操作，还需对这些卵母细胞进行体外构建（图 1）。因此，要获得转基因猴，必须先建立试管猴构建技术。其次，目前还没有一个成熟的可用于转基因猴构建的外源基因转染技术。由于胚胎数量有限，每次怀孕仅能着床 1 或 2 个胚胎，加之繁殖周期长，使低效的原核注射转基因技术（整合率 5%～10%）不能用于转基因猴的构建，需要建立一种更高效、经济的转基因猴构建技术。再次，同样受生殖生理特性的限制，在得到转基因首建猴后，还需要繁殖传代获得足够数量的转基因个体。

20 世纪 80 年代以来，以恒河猴和食蟹猴为主要研究对象的辅助生殖工作，经过 20 多年的努力，取得了长足的进展。在恒河猴的超数排卵、卵母细胞采集、体外胚胎构建和胚胎移植等方面都有所突破。但这些工作主要集中在少数几家实验室，并没有得到广泛的推广。恒河猴作为辅助生殖研究使用最多的非人灵长类动物，目前全球报道出生的“试管”后代也仅有 100 只左右，而食蟹猴则更是不足 50 只。资源有限、价格昂贵和没有强烈的需求动机是限制辅助生殖技术在非人灵长类上应用的主要原因。随着对人类医药和健康研究的深入，低等模式动物已经不能满足研究的需要，迫切需要建立诸如猴等高级动物模型，尤其是转基因非人灵长类动物构建的需求和可能性越来越大，这为非人灵长类动物辅助生殖研

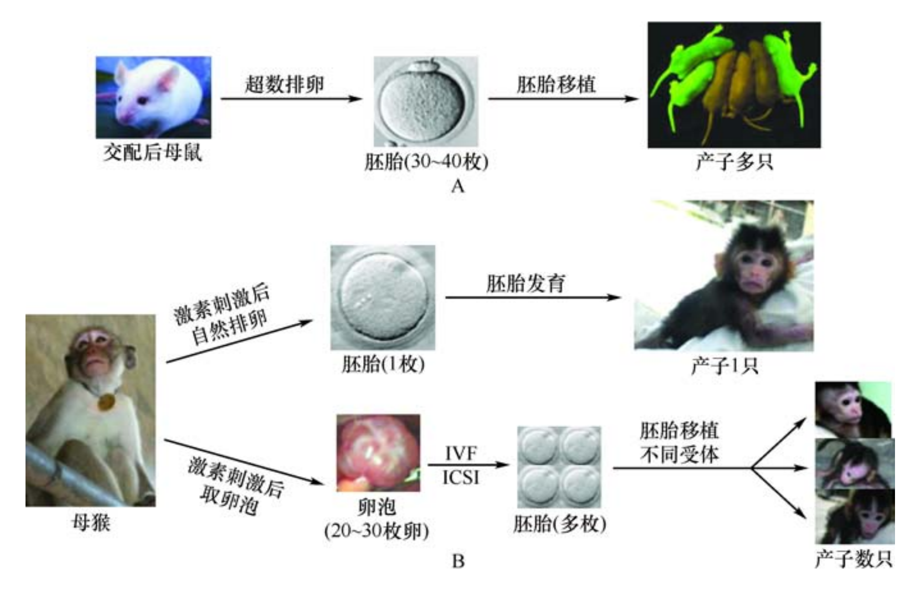


图 1　转基因小鼠（A）及转基因猴（B）的生殖生理差异

究提供了新动力。随着慢病毒介导的转基因技术出现，大大提高了外源基因转染效率，为移植少数胚胎构建转基因动物提供了可能。例如，Chan 等利用慢病毒出色地完成了转基因猴模型的构建工作。

目前转基因猴构建和培育工作仍面临如下两个难题：其一是慢病毒介导转基因技术的局限性，表现为容量低、易被修饰和多重整合易分离，因此只能满足部分基因的转基因工作需要，不能进行全面的推广。其二是获得首建转基因猴的繁育问题，一只转基因动物不能满足科研需要，因此获得转基因猴后要考虑的就是如何尽快繁殖扩群。

参 考 文 献

Chan AW, Homan EJ, Ballou LU, et al. 1998. Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. Proc Natl Acad Sci USA, 95(24): 14028～14033

Chan AW, Chong KY, Martinovich C, et al. 2001. Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes. Science, 291(5502): 309～312

Chan AW. 2004. Transgenic nonhuman primates for neurodegenerative diseases. Reprod Biol Endocrinol, 2: 39

Balmaceda JP, Gastaldi C, Ord T, et al. 1988. Tubal embryo transfer in cynomolgus monkeys: effects of hyperstimulation and synchrony. Hum Reprod, 3(4): 441～443

Kumar M, Keller B, Makalou NS, et al. 2001. Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors. Hum Gene Ther, 12(15): 1893～1905

Ng SC, Martelli P, Liow SL, et al. 2002. Intracytoplasmic injection of frozen-thawed epididymal spermatozoa in a nonhuman primate model, the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). Theriogenology, 58(7): 1385～1397

Wolf DP, Thormahlen S, Ramsey C, et al. 2004. Assisted reproductive technologies in rhesus macaques. Reprod Biol Endocrinol, 2: 37

Yang SH, Cheng PH, Banta H, et al. 2008. Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate. Nature, 453(7197): 921～924

撰稿人：孙　强

中国科学院上海生命科学研究院

骨是如何构塑与重建的

How Are Bone Modeling and Remodeling Going

1. 背景

2008 年初，中国“篮球长城”NBA 球员姚明由于左脚疲劳性骨折，缺席该赛季 NBA 的剩余比赛，当时甚至有媒体质疑他能否顺利参加北京奥运会。同样饱受疲劳性骨折折磨的中国著名女排球运动员赵蕊蕊在休战 1400 天后才复出，这一切都是疲劳性骨折惹的祸。

宇航员在太空飞行时，失重会造成骨量丢失，继而引起血液中的钙增加，容易引发肾结石。虽然大量喝水可以帮助排出结石，但在太空中，每一滴水都是很宝贵的。为此，美国科学家设想把尿液循环机送入太空，这样虽然能够解决“肾结石”的问题，却不能解决“骨量丢失”的问题。与此相似，处于生长期的青少年若在没有机械负荷的情况下生长，骨骼会变细，骨密度降低，发育为“铅笔”样长骨。2006 年有科学家以犬为模型，观察零负荷（disuse）对骨骼生长的影响，发现生长期的犬在零负荷时，长骨的横断面缩小，二阶面矩（second moment of area）也缩小（图 1）；骨骼已经发育成熟的犬在零负荷时，骨髓腔迅速扩大，皮质骨表现为强的多孔性（图 1）。

2. 科学意义

什么是疲劳性骨折？在正常的受力条件下，损伤（damage）的产生与骨重建（remodeling）清除损伤（damage removal）处于平衡中。但是，当受到的力负荷增多增大时，损伤的形成速度突然加快，就会破坏骨细胞网络（osteocyte network）的正常功能，导致骨细胞的凋亡，又启动了额外的骨重建。骨重建形成的多孔（porosity）结构域与原来存在的损伤共同导致了骨强度的降低和应变的增加，造成更多损伤的出现，继而在持续的负荷下，最终导致骨折的发生。

为什么失重条件下会出现骨量的丢失？上述动物模型显示，零负荷下，不仅骨量会发生变化，骨的形态也会发生变化，这让我们不得不将其与伴随其一生的“骨构塑与重建”联系到一起。

所以，了解正常状态及病理状态下“骨是如何构塑与重建的”对预防和治疗上述疾病有重要意义。

3. 最新进展

何为骨构塑与重建？宏观来讲，骨构塑（bone modeling）是在同一块骨的

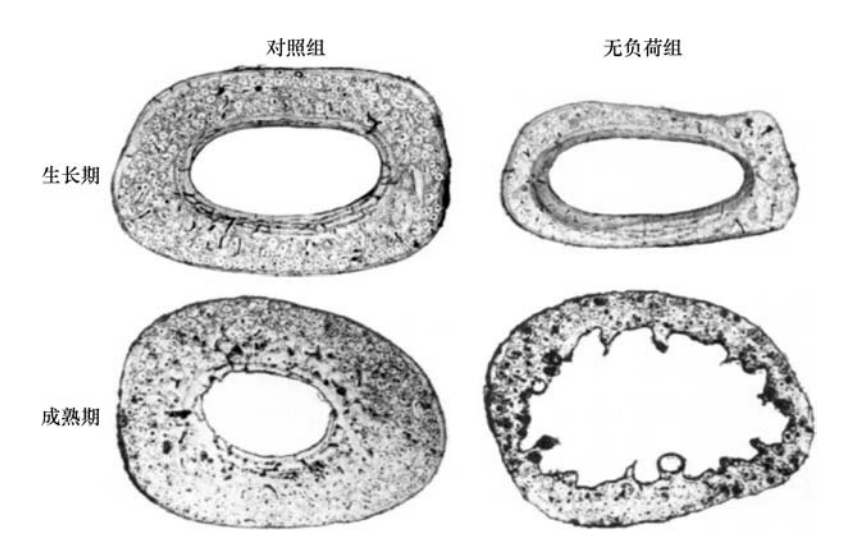


图1　40周零负荷下犬掌骨的横断面

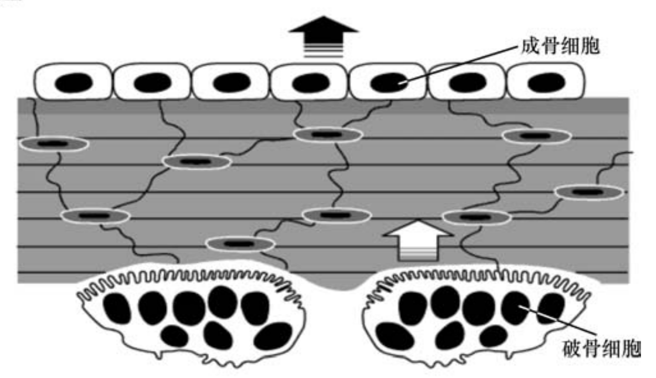
处于生长期的犬在无负荷时，骨膜的骨形成受到明显抑制，导致了长骨的横断面缩小，二阶面矩也缩小；成熟的成年犬在零负荷时，皮质骨内侧（endocortical）和小梁骨表面的骨重建增强，并伴随骨吸收加速，骨量丢失，并且皮质骨的孔隙增加。引自 Robling AG，et al. 2006. Annu Rev Biomed Eng

一个位置移除一些旧的骨组织而在另一个位置形成一些新的骨组织，最终导致骨形态的变化（图2)。骨重建（bone remodeling）又称为骨的改建或骨转换(bone turnover)，是指在骨的同一部位发生的骨吸收和骨形成偶联的少量骨质的循环性代谢过程，表现为同一部位的旧骨不断被吸收，新骨随之持续形成(图2)。

在细胞及分子水平上，2007年Tatsumi等通过骨细胞特异性去除的转基因小鼠模型（“osteocyte-less” mice）发现骨细胞的凋亡能够引起骨重建增强，造成严重的多孔性，并且这种转基因小鼠不会出现零负荷诱导的骨丢失现象。2009年，Lin等发现骨细胞中Sost（sclerostin）缺失的小鼠零机械负荷下不会出现骨量丢失。由此可见，骨细胞在骨构塑、重建中发挥重要的作用，也是两种病理状态下重要的中介元件。

何为骨细胞（osteocyte)？它为什么具有如此广泛的作用，扮演这么重要的角色？如图2所示，骨细胞是由成骨细胞（osteoblast）将自身包埋在合成的骨基质中形成的，骨细胞存在的位置称为骨陷窝，骨细胞表面存在很多细胞突起，这些细胞突起在微管（canallculi）中延伸，并与其他骨细胞或骨表面的成骨细胞通过间隙连接实现细胞通信。骨细胞遍布于骨基质的内部，有科学家提出“骨细胞是机械力的感受器”。





重建

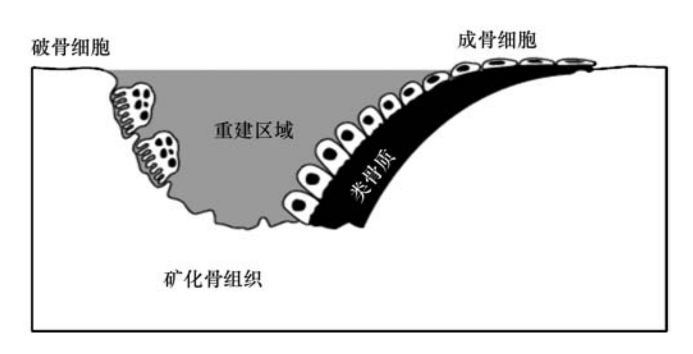


图 2　骨构塑与重建模式

引自 Rauch F，Glorieux FH. 2004

骨细胞不仅在机械力介导的骨构塑与重建中发挥重要作用，科学研究显示其也是激素等体内系统调节骨构塑与重建的重要中介元件。

4. 主要难点

骨细胞是如何感知外力的？为什么在人的生长期骨构塑被启动，并且以成骨为主？该过程中骨细胞接受外界刺激后发出了怎样的信号？骨细胞凋亡后又发出了怎样的信号，诱导了骨重建的增强，造成疲劳性骨折？失重状态下，骨细胞又发生了怎样的变化？2009 年，Lin 等的发现为我们解决“宇航员的骨量丢失”问题提供了药物靶点，但还需要更深入的研究，例如 Sost 是怎样介导的这种效应，零负荷是怎样调控该分子的？骨重建的启动需要破骨细胞首先吸收旧的骨组织，那么破骨细胞是如何定位到需要骨重建的位置的？有科学家推测骨细胞发出的信号传递到微管中的血管中，刺激血管内的单核细胞到骨重建位置，但这还需要进一步实验证明。

5. 展望

目前，由于骨细胞在骨组织中的位置隐蔽，很难分离并进行体外培养，阻碍了生物学家对其进行细胞和分子生物学研究。而骨细胞是骨构塑和重建的重要元件，以骨细胞为切入点，通过探讨骨构塑和重建的机制可能为预防和治疗骨质疏松、疲劳性骨折、失重造成的骨丢失提供新的思路。因此，该领域的研究虽然存在很多困难，但科学家还是在寻求新思路、新方法，争取有新的突破。2007 年，美国科学家 Tatsumi 通过巧妙的体内试验证实骨细胞在机械力传导中起到必不可少的作用，该试验为我们以后的研究奠定了基础。相信以后随着科学技术的迅猛发展，科技人才辈出，相关疾病的治疗难题将逐渐得到解决。

参考文献

Bakker AD, Silva VC, Krishnan R, et al. 2009. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta modulate calcium and nitric oxide signaling in mechanically stimulated osteocytes. Arthritis Rheum, 60(11): 3336～3345

Cardoso L, Herman BC, Verborgt O, et al. 2009. Osteocyte apoptosis controls activation of intracortical resorption in response to bone fatigue. J Bone Miner Res, 24(4): 597～605

Emerton KB, Hu B, Woo AA, et al. 2009. Osteocyte apoptosis and control of bone resorption following ovariectomy in mice. Bone, 46(3): 577～583

Kogianni G, Mann V, Noble BS. 2008. Apoptotic bodies convey activity capable of initiating osteoclastogenesis and localized bone destruction. J Bone Miner Res, 23(6): 915～927

Lin C, Jiang X, Dai Z, et al. 2009. Sclerostin mediates bone response to mechanical unloading through antagonizing Wnt/beta-catenin signaling. J Bone Miner Res, 24(10): 1651～1661

O'Brien CA, Plotkin LI, Galli C, et al. 2008. Control of bone mass and remodeling by PTH receptor signaling in osteocytes. PLoS One, 3(8): e2942

Robling AG, Castillo AB, Turner CH. 2006. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. Annu Rev Biomed Eng, 8: 455～498

Seeman E. 2003. Periosteal bone formation—a neglected determinant of bone strength. N Engl J Med, 349(4): 320～323

Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, et al. 2007. Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. Cell Metab, 5(6): 464～475

撰稿人：韩金祥　周小艳

山东省医学科学院

肿瘤细胞能否被驯化

Can Cancer Cells Be Tamed

肿瘤是机体在各种致瘤因素作用下，局部组织的某一个细胞在基因水平上失去对其生长的正常调控，导致其克隆性异常增生而形成的新生物。肿瘤的历史可能与人类的历史一样久远。现存最早的关于肿瘤的记载出现在公元前3000～前1500年，古埃及人在草纸上记录了8例乳腺肿瘤。这份草纸由美国埃及学研究先驱Edwin Smith于1826年在埃及卢克索（Luxor）发现并收藏，因而被命名为“Edwin Smith草纸”。随后，在希波克拉底时代及中国的《黄帝内经》中都有了比较详细的关于肿瘤症状、成因及治疗的系统描述。因此，可以说人类与肿瘤的抗争并非一朝一夕，而是穿越古今的博弈。

肿瘤的成因包括遗传学改变（如基因突变）或表观遗传学异常（如DNA的甲基化异常、组蛋白修饰改变等）或二者兼有。目前，关于肿瘤的治疗策略，包括手术治疗、化疗、放疗、生物治疗等。这些策略的一个共同特点就是“强攻”，即试图“完全杀灭肿瘤”。然而，经历了一个世纪的不懈努力，这些以“强攻”为目标的现代肿瘤治疗方法仍无法明显改善肿瘤患者的死亡率。其中，手术后和放、化疗后，肿瘤的复发、转移、多药耐药、放疗和化疗的严重毒副作用，包括对患者免疫系统的致命打击和多重癌的诱发等问题都是肿瘤治愈的难题。然而，肿瘤并没有因为人类对其治疗的不乐观而“大发善心”停止在人类的蔓延。据统计，每四个去世的中国人中就有一人死于癌症。癌症发病数以年均3%～5%的速度递增，癌症已成为人类第二位死因。世界卫生组织国际癌症研究中心日前公布的一份研究报告说，根据目前癌症的发病趋势，2020年全世界癌症发病率将比现在增加50%，全球每年新增癌症患者人数将达到1500万。由此可见，在现代医学与癌症短兵相接的百年历史中，人类在这场抗癌斗争中至今仍是“失败者”。

肿瘤细胞最大的生物学特性是无限制增殖和不良分化。如前所述的试图以“完全杀灭肿瘤”为目标的现代肿瘤治疗手段对于肿瘤治疗效果的不理想，提示“强攻”可能不是治疗肿瘤最理想的策略。于是，有科学家提出应改变基于“强攻”策略的传统临床思维与观念，应该考虑癌细胞具有潜在的可逆转性，即诱导瘤细胞向终末细胞分化（即驯化瘤细胞），从而使之失去无限增殖的能力。如果能很好地驯化瘤细胞，将为肿瘤治疗带来革命性变化。1971年

Friend首次报道，二甲基亚砜可诱导小鼠红白血病细胞系分化，分化后的细胞合成了血红蛋白。之后，有研究者将小鼠睾丸畸胎瘤细胞注入小鼠胚囊培养后再植入假孕的雌鼠子宫内，结果生出完全正常的小鼠。诸如此类的研究表明，肿瘤细胞有被驯化的可能性。那么，如何去驯化肿瘤细胞是目前肿瘤治疗中亟须解决的一大难题。

目前对于肿瘤细胞的驯化主要采用的是诱导分化的方法，即在分化诱导剂的作用下，让肿瘤细胞向正常或接近正常细胞的方向分化逆转。例如，用全反式维A酸诱导分化治疗人急性早幼粒细胞白血病；用人参皂苷等中药诱导小鼠黑色素瘤细胞B16、小鼠肉瘤-180腹水型（S-180A）及人早幼粒白血病细胞系HL-60细胞分化；此外，cAMP及其衍生物和cAMP的降解阻滞剂如ATP、茶碱等也被公认能抑制细胞的恶性增殖，在形态或生化上重新出现分化特征，因此成为又一类重要的分化诱导剂。这些诱导分化剂的主要作用机制在于调控肿瘤细胞的信号转导途径、细胞膜系统、细胞酶学或者调节癌基因与抑癌基因的表达，其对血液系统瘤细胞的作用较为显著，而对实体瘤细胞的分化诱导则较困难。其根本原因还是在于没有找到肿瘤细胞之所以会去分化的真正靶点。

在对细胞逆向分化的研究中，诱导性多潜能干细胞（induced pluripotent stem cell，iPS细胞）的获得是一重大进展和突破。2006年开始，日本和美国的研究小组在分别利用载体将Oct4、Sox2、c-Myc、Klf4和Oct4、Sox2、Nanog、Lin28两套基因转入小鼠成纤维细胞中，均获得类似胚胎干细胞的克隆。这样通过特定的基因转染和体细胞基因的重编程而获得的类似胚胎干细胞的细胞命名为iPS细胞。此举找到了调控从体细胞向iPS细胞逆向分化的关键基因，打破了此前关于干细胞分化和培养的传统观点。而肿瘤细胞与胚胎干细胞有相似的特点——无限增殖与去分化，那么，能否借鉴上述策略诱导肿瘤细胞向正常的终末细胞进行分化呢？即能否找到控制肿瘤细胞向正常终末细胞进行分化的某几个关键基因，进而驯化肿瘤细胞呢？要在这一领域实现突破，其主要困难在于：①涉及肿瘤发生发展、去分化及无限增殖的基因很多，其中哪一个或哪几个基因是关键基因难以确定；②即使找到关键基因，采用什么方法去调控这些基因的表达（上调或下调）难以确定。就研究现状而言，若涉及基因的遗传学改变，有可能采用功能获得（gain of function）或功能丧失（loss of function）的策略；若涉及表观遗传学异常，可采用调节表观遗传学的策略。

虽然驯化肿瘤细胞的道路荆棘密布、困难重重，但人类已对“一旦成为癌细胞，永远是癌细胞”的传统观念提出了有力的挑战，将为抗肿瘤研究开辟一条崭新的途径。一旦能够成功驯化肿瘤细胞，将为肿瘤治疗带来革命性变化，人类也将最终彻底征服肿瘤。

参考文献

Frankel SR, Eardley A, Heller G, et al. 1994. All-trans retinoic acid for acute promyelocytic leukemia—results of the New York Study. Ann Intern Med, 120(4): 278～286

Friend C, Scher W, Holland JG, et al. 1971. Hemoglobin synthesis in murine virus-induced leukemic cells in vitro: stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide. Proc Natl Acad Sci USA, 68(2): 378～382

Hartman M, Loy EY, Ku CS, et al. 2010. Molecular epidemiology and its current clinical use in cancer management. Lancet Oncol, 11(4): 383～390

Odashima S, Ohta T, Kohno H, et al. 1985. Control of phenotypic expression of cultured B16 melanoma cell by plant glycosides. Cancer Res, 45(6): 2781～2784

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell, 131(5): 861～872

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science, 318(5858): 1917～1920

撰稿人：何凤田
第三军医大学

核小体组蛋白的化学修饰调控基因表达的机制

The Regulation Mechanism of Gene Expression on the Chemical Modification of Nucleosome Histone

1. 背景及意义

基因表达（gene expression）是将基因所携带的遗传信息释放出来指导生物性状表达的过程。调控真核生物基因表达的机制十分复杂，涉及多个环节，且首先发生在染色质活化水平。基因转录是遗传信息传递中心法则的第一个环节，转录前染色质结构发生一系列重要变化是基因转录的前提。核小体（nucleosome）是染色质的基本结构单位，组蛋白八聚体构成核小体的核心区，其外面盘绕着DNA双螺旋链，每个组蛋白的N末端都会伸出核小体外，形成组蛋白的尾巴。这些尾巴是组蛋白化学修饰的位点，不仅与染色质的结构和功能状态紧密相关，而且在决定细胞命运中发挥着重要的作用。因此，阐明组蛋白的化学修饰如何调控基因表达是一个非常重要的问题。

2. 现状及难点

组蛋白（histone）是一组进化上非常保守的小分子碱性蛋白质，其中碱性氨基酸（Lys、Arg）约占25%，分为五种类型（H_1、H_2A、H_2B、H_3、H_4），由两个H_2A-H_2B二聚体与H_3-H_4四聚体形成组蛋白八聚体，构成核小体的核心。所有的组蛋白都可以发生化学修饰，在它们的某些氨基酸残基的游离基团上，能够共价连接其他基团甚至分子。常见的组蛋白尾巴修饰方式包括乙酰化、甲基化、磷酸化、泛素化等。研究表明它们可以通过影响组蛋白与DNA双链的亲和性，从而改变染色质的疏松或凝集状态；或通过影响其他转录因子与结构基因启动子的亲和性来发挥基因表达调控的作用，但是调控机制至今不详。

(1) 乙酰化与基因调控：目前研究得最多的组蛋白修饰是Lys残基N末端的乙酰化（acetylation）修饰，它也是最主要的组蛋白化学修饰方式。它与染色质的打开、基因的转录激活有关，与之相反，组蛋白去乙酰化与基因沉默有关，而且组蛋白去乙酰化酶被认为是转录共抑制因子。

乙酰化是由组蛋白乙酰基转移酶（HAT）催化，是最早被发现的与转录有关的组蛋白修饰，而去乙酰化由组蛋白去乙酰基酶（HDAC）催化。乙酰化对基因调控的影响据推测可能是由于组蛋白尾巴Lys残基的乙酰化能够使组蛋白携

带正电荷量减少，降低其与带负电荷 DNA 链的亲和性，促使参与转录调控的各种蛋白因子与 DNA 结合，进而发挥转录调控作用。由于体内存在组蛋白乙酰化和去乙酰化的平衡关系，所以组蛋白乙酰化的发生频率很低，乙酰化主要发生在组蛋白 H_3 和 H_4 的 N 端尾巴比较保守的 Lys 残基上。利用特殊的 HAT 可将特异性位点的赖氨酸残基乙酰化。组蛋白乙酰化和染色质构型重建都能作用于相同的启动子来参与表达调控，因此两者在功能上相互联系，但究竟两者谁前谁后到目前为止尚未见报道。

(2) 甲基化与基因调控：组蛋白甲基化（methylation）是指发生在 H_3 和 H_4 组蛋白 N 端 Lys 或 Arg 残基上的甲基化，由组蛋白甲基化转移酶（HMT）催化。组蛋白 H_3 的第 4、9、27 和 36 位及 H_4 的第 20 位 Lys，H_3 的第 2、17、26 位及 H_4 的第 3 位 Arg 都是甲基化的常见位点。对组蛋白甲基化与基因表达调控的研究主要集中在 H_3 的 Lys4 和 Lys9 上。组蛋白 H_3 的 Lys4 甲基化与转录的活化状态有关。

组蛋白甲基化的功能主要体现在异染色质形成、基因印记、X 染色体失活和转录调控方面。目前发现 24 个组蛋白甲基化位点，其中 17 个位于 Lys，其他 7 个位于 Arg。Lys 可以是单甲基化、双甲基化和三甲基化，Arg 也可以是单甲基化或者双甲基化。如果把这 3 种甲基化状态都考虑在内，应该一共有 3×10^{11} 种组蛋白甲基化组合状态，复杂的组合为组蛋白甲基化发挥功能调控作用提供更大的潜能。目前证实组蛋白甲基化与去甲基化失平衡与肿瘤发生相关，组蛋白赖氨酸去甲基化酶有可能成为一个新的抗肿瘤治疗靶标。

(3) 磷酸化与基因调控：组蛋白磷酸化（phosphorylation）是指对组蛋白 N 端氨基酸残基的磷酸化修饰。磷酸基团携带的负电荷中和了组蛋白上的正电荷，造成组蛋白与 DNA 之间亲和力的下降，使得染色质结构不稳定，这对有丝分裂时染色质凝集成为同源染色体过程中的结构重组是必要的。不同组蛋白的磷酸化位点和作用不尽相同。例如目前已知的组蛋白 H_3 的磷酸化主要在其第 10、28 位 Ser（Ser10/Ser28）和第 3、11 位 Thr（Thr3/Thr11）上。2000 年，Nowak 报道了果蝇热休克基因调节伴随有 H_3 上的 Ser10 的大量磷酸化，表明 Ser10 磷酸化对有丝分裂的启动非常重要。此外，组蛋白磷酸化与染色质凝集、转录激活、细胞凋亡及 DNA 损伤的修复等过程中的调控作用越来越多地被发现。

(4) 泛素化与基因调控：泛素化（ubiquitination）是一种重要的组蛋白修饰形式。组蛋白 H_2A 在 1975 年被首次发现有泛素化修饰，其泛素化修饰位点是高度保守的 Lys（Lys119）位点。除了 H_2A 以外，组蛋白 H_2B 也可以被泛素化修饰，组蛋白 H_2A、H_2B 的泛素化修饰对基因的表达有调控作用。此外，在对果蝇体外实验的研究中发现，真核生物基因转录所必需的通用转录因子 TFⅡD 的

成分TAFⅡ250，能够参与组蛋白H_1泛素化激活、共轭接合，这也是首次报道同一个蛋白质内有E_1、E_2两种酶的活性。相比较而言，组蛋白H_3、H_1的泛素化形式比H_2A、H_2B少，目前也还没有发现组蛋白H_3、H_1的泛素化位点。

(5)其他DNA结合蛋白的作用：组蛋白的化学修饰还需其他调控基因转录的蛋白质，这些功能分子与蛋白质接合搭建了一个平台。许多与组蛋白修饰有关的转录共激活因子（co-activator）和共阻遏蛋白（co-repressor）相继被发现，这些发现将染色质结构摆到了基因调控研究的中心。越来越多的研究结果显示，染色质在基因调控中发挥着重要作用。

3. 进展及展望

值得注意的是，单一组蛋白的化学修饰往往不能独立地发挥作用，一个或多个组蛋白尾巴的不同修饰依次发挥作用或组合在一起，形成一个修饰的级联，它们通过协同或拮抗来共同发挥作用。这些多样性的修饰以及它们时间和空间上的组合与生物学功能的关系可作为一种重要的表观标志或语言，被称为“组蛋白密码”(histone code)。组蛋白密码学说的提出，大大丰富了人们对遗传信息的认识，使得组蛋白修饰的研究备受瞩目。

总之，特定的组蛋白修饰与特定的基因激活或抑制状态相联系，组蛋白修饰在基因调控中发挥了重要作用。最新研究表明，在转录中组蛋白并不是被动的参与者，特定的组蛋白修饰（如甲基化和乙酰化）与基因表达的水平是相关的，而且组蛋白的微小改变就可以对基因转录产生重大影响。因此，深入研究组蛋白化学修饰的级联方式及调控转录的机制仍是今后研究的热点和难点。

参考文献

沈珝琲，方福德. 1999. 真核基因表达调控. 北京：高等教育出版社、施普林格出版社，5～9

田筱青，房静远. 2006. 组蛋白甲基化研究进展. 生物化学与生物物理进展，33(6)：511～516

Choi JK, Howe LJ. 2009. Histone acetylation: truth of consequences. Biochem Cell Biol, 87(1): 139～150

Karlić R, Chung HR, Lasserre J, et al. 2010. Histone modification levels are predictive for gene expression. Proc Natl Acad Sci USA, 107(7): 2926～2931

Koriakov DE. 2006. Histone modification and regulation of chromatin function. Genetika, 42(9): 1170～1185

Kornberg RD, Thomas JO. 1974. Chromatin structure; oligomers of the histones. Science, 184(139): 865～868

Lennartsson A, Ekwall K. 2009. Histone modification patterns and epigenetic codes. Biochim Biophys Acta, 1790(9): 863～868

Nowak SJ, Corces VG. 2000. Phosphorylation of histone H_3 correlates with transcriptionally ac-

tive loci. Genes Dev, 14(23): 3003～3013

Pham AD, Sauer F. 2000. Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAF Ⅱ 250, a mediator of activation of gene expression in drosophila. Science, 289(5488): 2357～2360

Strahl BD, Allis CD. 2000. The language of covalent histone modifications. Nature, 403(6765): 41～45

撰稿人：于晓光
哈尔滨医科大学

蛋白质特异相互识别的分子基础及其与疾病发生的关联

The Molecular Basis of the Specific Recognition in Protein-Protein Interaction and Its Relevance to Diseases

1. 难题的提出及其研究意义

蛋白质作为重要的基因产物，是机体生命活动的主要执行者。体内大多数蛋白质均是以复合物的形式存在并发挥作用的。因此，细胞的各种重要生理活动，细胞对外界环境及内环境作用的反应等，均是以蛋白质间相互作用（蛋白质互作）为纽带，形成信号转导网络系统——转录和转录调控、代谢作用过程、信号级联放大。据预测，人体内蛋白质相互作用的数量大约为 65 万个，是果蝇的 10 倍，是单细胞酵母等的 20 倍。这与基因数的比较结果相差巨大——人类的基因数大约为 2.4 万个，果蝇的基因数大约为 1.4 万个。可以说，蛋白质相互作用是细胞生命活动的基础，参与了机体几乎所有的生理过程，并与许多疾病（如肿瘤、代谢性疾病、神经退行性疾病等）的发生发展具有密切的关系。认识蛋白质相互作用是理解各种生命现象本质和规律的必要前提，亦可为疾病的诊断、预防和治疗提供新的思路和手段。蛋白质互作是当今相互作用组学（interactomics）研究的核心。

2. 难题研究现状

蛋白质相互作用除与微环境（蛋白质浓度、电解质、溶液基质、温度、分子距离等）密切相关外，蛋白质的一级结构即氨基酸序列更是其相互作用的重要基础。两个或两个以上蛋白质氨基酸之间的疏水作用、氢键和静电相互作用均参与了蛋白质相互作用。这些作用可见于作为介导蛋白质-蛋白质相互作用的结构域（domain）中，比较清楚的有 PDZ 结构域、LIM 结构域、DD 结构域、SH 结构域、PH 结构域、EH 结构域、POU 结构域、LZ 结构域、PX 结构域等。例如，LZ 结构域（亮氨酸拉链，leucine zipper）通常为 4～7 个重复的亮氨酸残基，形成螺旋式盘旋结构，可以调节蛋白质的寡聚化、稳定性和特异性。原癌基因 c-fos的蛋白质产物不能形成同源二聚体，但它可以与 c-Jun 的蛋白质产物中的“拉链”形成异源二聚体。c-fos 的蛋白质产物本身不能与 DNA 结合，可是一旦形成“拉链”的异源二聚体后，就具有 DNA 结合能力。

目前，蛋白质相互作用的研究方法主要有免疫共沉淀法、双杂交系统、噬菌

体展示技术、抗体与蛋白质微阵列技术、pull-down 技术、生物发光共振能量转移技术（FRET）、表面等离子共振（SRP）、串联亲和纯化、蛋白质芯片等。随着计算机技术的高速发展，已经出现了一些依赖于生物信息学的计算机分子模拟法。例如，同源建模是利用已知的蛋白质三级结构为参照，分析氨基酸序列相近的新蛋白的三级结构。常用的方法有两类：一是利用蛋白质分析软件来预测，例如 SWISS-MODEL 是一项预测蛋白质三级结构的服务，它利用同源建模的方法实现对一段未知序列的三级结构的预测；另一种是对新蛋白的结晶进行 X 射线衍射或磁共振技术获得结构信息，以已知的蛋白质立体结构为参照，利用软件建立新蛋白的立体结构。计算机分子动力模拟（molecular dynamics simulation，MD simulation）是按时间序列描述分子中每个原子的运动轨迹，模拟分子各种层次上的运动行为，探索各种分子内部变化的计算机模拟方法。它是将蛋白质分解成由 n 个原子或分子组成的粒子系统，通过量子力学势能函数求导得出各粒子间的作用力，忽略量子效应后，根据能量最小化原则，确定蛋白质-蛋白质相互结合。

3. 难题拟研究的关键问题

尽管近年来对蛋白质-蛋白质相互作用（简称互作）的现象已经有了一定的了解，但对其特异识别的分子基础及其互作的生物学意义尚缺乏系统、全面的理解。本难题需要解决的主要问题有：

（1）进一步阐明互作蛋白质中氨基酸-氨基酸、肽段-肽段（motif，domain）互作的分子基础与规律，以及蛋白质修饰（如磷酸化）对互作的影响；开发蛋白质结构测定的实验技术，如对蛋白质疏水内核的折叠过程和稳定性研究、表面疏水与亲水基团的自由度和互相影响的测定技术；提高蛋白质结构预测的准确性，探讨蛋白质-蛋白质互作（分子对接）的模型和动力学过程等。

（2）发展快速、准确的预测蛋白质相互作用的生物学软件。必须将蛋白质互作的复杂网络结合在一起考虑：蛋白质独自或结合在一起作为转录因子及蛋白质局部丰度的调节；作为酶类，它们催化并且协调细胞的新陈代谢过程；在信号级联放大过程中，它们作为内部、外部的刺激因子激活其他的蛋白质。所有这些过程都表明它们可以导致蛋白质相互作用和复合物的形成或者解离。因此研究模式生物相互作用组的关键步骤是将蛋白质-蛋白质、蛋白质-DNA 及蛋白质-小分子相互作用整合在一起研究。

（3）发展快速、准确和高通量的验证蛋白质相互作用的分子生物学方法与技术。如蛋白质交联技术与质谱结合分析蛋白质互作；改进磁共振（NMR）技术，在微秒至毫秒时间范围的动力学测定蛋白质互作，能从三维结构更清晰地观察作用位点；利用荧光等分子标记技术开发活细胞甚至是活体追踪蛋白质互作的技术；蛋白质靶向运输、亚细胞定位、分泌、转运过程等；微流体和纳米技术在蛋

白质互作，如亲和力分析中的应用等。

(4) 进一步阐明蛋白质互作与重大疾病（肿瘤、代谢性疾病、神经退行性疾病、严重感染性疾病等）发生、发展的关系，开发小型（某种特定状态）但是高度特异性的蛋白质-蛋白质相互作用集合分析。

(5) 探讨影响或控制蛋白质互作作为药物靶点和研发新药的可能性，如蛋白质互作中小分子抑制剂或激动剂的设计、纳米管给药等。

参考文献

龚燕华，彭小忠. 2010. 蛋白质相互作用及亚细胞定位原理与技术. 北京：中国协和医科大学出版社

Kelly W, Stumpf M. 2008. Protein-protein interactions: from global to local analyses. Curr Opin Biotechnol, 19(4): 396～403

Ofran Y, Rost B. 2003. Predicted protein-protein interaction sites from local sequence information. FEBS Letters, 544(1-3): 236～239

Ryan DP, Matthews JM. 2005. Protein-protein interactions in human disease. Current Opinion in Structural Biology, 15: 441～446

Stumpf MP, Thorne T, de Silva E, et al. 2008. Estimating the size of the human interactome. Proc Natl Acad Sci USA, 105(19): 6959～6964

Tang X, Bruce JE. 2010. A new cross-linking strategy: protein interaction reporter (PIR) technology for protein-protein interaction studies. Mol Biosyst, 6(6): 939～947

Umetsu M, Nakanishi T, Asano R, et al. 2010. Protein-protein interactions and selection: generation of molecule-binding proteins on the basis of tertiary structural information. FEBS J, 277(9): 2006～2014

Venkatesan K, Rual JF, Vazquez A, et al. 2009. An empirical framework for binary interactome mapping. Nat Methods, 6(1): 83～90

Wilson AJ. 2009. Inhibition of protein-protein interactions using designed molecules. Chem Soc Rev, 38(12): 3289～3300

Wittig I, Schägger H. 2009. Native electrophoretic techniques to identify protein-protein interactions. Proteomics, 9(23): 5214～5223

撰稿人：焦炳华　王梁华

第二军医大学

微小 RNA 表达调控规律、网络及其生物学意义

Network and Biological Significances of miRNA Expression Regulation

1. 难题的提出及其研究意义

微小 RNA（microRNA、miRNA）是一类参与基因转录后水平调控的非编码小分子 RNA，其基因存在于基因组的间隔区或者内含子当中，它们的表达具有组织特异性或发育阶段特异性。miRNA 与细胞增殖、分化、死亡（凋亡）及个体发育等具有非常密切的关系。当前，miRNA 的研究大多集中在其表达谱、被调控的靶基因及调控后的生物学效应等方面，而涉及 miRNA 自身的表达是如何被调控的很少。因此，“全景式”地了解 miRNA 的表达模式与规律，以及 miRNA 调控的基因网络、蛋白质相互作用网络、细胞信号转导网络的特征，将对阐明 miRNA 的调控规律起到重要的作用。

2. 难题研究现状

近年来，国内外 miRNA 的研究主要集中在以下四个方面：①各种生物或组织（病毒、模式生物、人类多种疾病组织等）miRNA 表达研究。至 2010 年 4 月 15 日，miRBase 序列数据库（http://microrna.sanger.ac.uk/）共收录了各种生物来源的 14 197 条 miRNA 序列和注释数据。②miRNA 靶基因的预测和验证方法，包括靶基因预测（基于同源比对的方法，结合芯片数据的方法等），启动子结合分析（MiRseeker、miRanda、DIANA-microT、TargetScan、Pathway 等软件）。③miRNA 对基因表达调控的机制研究。除已明确的 mRNA 降解和衰减机制外，还陆续提出了翻译起始抑制，翻译起始后抑制，P 小体（processing body）、应激颗粒（stress granules）扣押靶 mRNA 等机制；此外，最近又发现了 miRNA 对基因表达的去抑制和激活作用。④miRNA 定量检测方法的研究与发展，包括基于探针杂交技术的 Northern blot 法、微阵列芯片法、纳米金标记法、桥连放射性核素标记法，以及基于扩增技术的定量 PCR 检测法、滚环扩增法、引物入侵法和新一代大规模高通量测序法等。

3. 难题拟研究的关键问题

尽管近年来对 miRNA 的表达、靶基因、作用机制及实际应用的可能性有了一定的了解，但对其表达调控的规律、网络特征，以及所包含的生物学意义尚缺

乏系统、全面的理解。本难题需要解决的主要问题有：

（1）发展新的、快速、准确的预测 miRNA 靶基因的生物信息学方法和生物学软件，发展新的、快速、准确和高通量验证 miRNA 与靶基因作用的分子生物学方法与技术。

（2）“全景式”地了解 miRNA 的表达调控与规律，以及 miRNA 调控的基因网络、蛋白质相互作用网络、细胞信号传导网络的特征。研究 miRNA 在正常条件下的表达情况，包括组织特异性或发育阶段特异性，阐明其与细胞增殖、分化、死亡（凋亡）等的相关性，建立 miRNA 表达谱；研究 miRNA 表达调控机制与规律，包括其自身是如何被调控的，它们又是如何调控相应的靶基因的，建立 miRNA 调控网络；在此基础上，构建全面的 miRNA 调控基因-蛋白质-信号通路网络图。

（3）进一步阐明 miRNA 与重大疾病（肿瘤、代谢性疾病、神经退行性疾病、严重感染性疾病等）发生、发展的关系。目前通过基因芯片方法，已筛选出数百种与恶性肿瘤、艾滋病、糖尿病、系统性红斑性狼疮等相关的 miRNA。随着研究的不断深入，将会发现新的、更多的疾病相关 miRNA。下一步的重要工作就是进一步阐明这些 miRNA 与疾病发生、发展的关系，建立 miRNA 与各类疾病的关系联络图。

（4）探讨 miRNA 作为疾病诊断生物标志、疾病治疗靶点及开发成为新一代基因药物的可能性。例如，发现 miR-206 能激活神经-肌肉的相互联系，促进神经-肌肉突触的再生，从而减轻肌萎缩性侧索硬化（ALS）的进程，有望用于 ALS 的治疗。再如，丙型肝炎病毒以其产生的 miR-122 感染肝细胞，应用 SPC3649 可显著抑制丙型肝炎病毒感染黑猩猩的 miR-122 表达。因此，miR-122 可作为丙肝治疗的有效靶点。随着研究的不断深入，将会发现更多的可作为疾病诊断生物标志、疾病治疗靶点及基因药物的 miRNA 并得到实际应用。

参考文献

Corcoran DL, Pandit KV, Gordon B, et al. 2009. Features of mammalian microRNA promoters emerge from polymerase Ⅱ chromatin immunoprecipitation data. PLoS ONE, 4(4): e5279

Hwang HW, Wentzel EA, Mendell JT. 2007. A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. Science, 315(5808): 97～100

Khraiwesh B, Arif MA, Seumel GI, et al. 2010. Transcriptional control of gene expression by microRNAs. Cell, 140(1): 111～122

Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, et al. 2010. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. Science, 327(5962): 198～201

Megraw M, Hatzigeorgiou AG. 2010. MicroRNA promoter analysis. Methods Mol Biol, 592: 149～161

Wang Z, Yang B. 2010. MicroRNA expression detection methods. Heidelberg: Springer-Verlag

Watanabe Y, Tomita M, Kanai A. 2007. Computational methods for microRNA target prediction. Methods in Enzymology, 427: 65～86

Williams AH, Valdez G, Moresi V, et al. 2009. MicroRNA-206 delays ALS progression and promotes regeneration of neuromuscular synapses in mice. Science, 326(5959): 1549～1554

撰稿人:焦炳华　陈　欢

第二军医大学

生物衰老的分子机制研究

Molecular Mechanism of Aging

衰老是绝大多数生物都必须面临的过程，表现为机体响应胁迫环境的能力下降、内环境失衡和疾病发生的危险性增高等现象。而衰老的分子机制还不清楚，涉及基因、蛋白质、代谢产物等诸多层面的影响，需要进行全面、系统的研究。目前关于衰老的理论假说很多，现代生命科学的发展为从分子机制层面上检验和统一这些理论提供了机遇。从生命科学自身的发展来看，系统生物学的出现和发展将为研究衰老的分子机制这一目标提供技术保障。

研究衰老分子机制的最终目标是阐明衰老过程的控制参量。理论假设是生物系统由各个子系统构成，如能量产生系统、基因组稳定性维护系统、自由基清除系统等。这些系统之间相互作用，使得整体作用大于部分之和。衰老过程在某种意义上正是子系统之间协同性的退化过程。已经发现了几个与衰老密切相关的子系统，包括insulin/IGF-1相关、TOR相关、HSF相关、SIR2相关、代谢相关、线粒体相关、端粒相关、凋亡相关（如p16INK4a/Rb途径、p19ARF/p53/p21Cip1途径和PTEN/p27Kip1途径）等。这些子系统具有相对的进化保守性，广泛存在于从酵母到哺乳动物等生物中。有关研究证明，通过摄动这些子系统网络中的节点可以影响生物的寿命。这些子系统之间的联系也已经初步得到了揭示。

这里简要介绍SIR2子系统的作用机制。SIR2是一类NAD依赖的去乙酰化酶，在进化上很保守，从细菌到人类均发现SIR2的同源基因。在酵母的研究中表明，SIR2为一长寿关键蛋白，并通过抑制编码核糖体的DNA（rDNA）重组起作用。增加单一拷贝可有效抑制rDNA重组并延长寿命达40%；相反，若敲除SIR2则增加rDNA重组率10倍并加速衰老。研究显示，SIR2在热量限制导致长寿效应中也起着关键作用。SIR2突变株在0.5%或0.1%葡萄糖培养基培养的条件下并无寿命延长表型。在线虫直至哺乳动物细胞中，核蛋白SIR2通过去乙酰化的方式调节一些重要衰老相关蛋白的活性。在线虫中，过表达SIR2同源蛋白SIR2.1可导致线虫寿命的延长。这一效应依赖于胰岛素信号转导途径中一重要蛋白DAF16，但具体作用机制并不清楚。

SIR2受到多酚类小分子物质resveratrol的调控。线虫研究表明，SIR2.1在resveratrol调控下的抗衰老机制不依赖于DAF16，而是通过调节一类内质网

胁迫响应基因的表达实现，可见 SIR2 的功能及其在衰老机制中作用方式是复杂而多样的。SIR2.1 在衰老相关网络中是一中心节点，与多种生物过程密切相关。哺乳动物细胞中 SIR2 同源蛋白 SIRT1 可通过对促凋亡因子 p53 的去乙酰化的负调控起到抑制凋亡的作用。这些均表明 SIR2 及其同源蛋白在细胞水平及动物水平起到的生存调节作用是保守的。在哺乳动物中，目前也发现 SIRT1 参与了 FOXO3-HSF1 所调节的衰老过程途径。FOXO3 为一转录因子，通过转录一系列下游基因起到延缓衰老的作用。FOXO3 的合成在胞质中完成，必须进入细胞核才能完成转录任务，其入核过程受到多重调控，包括多位点的乙酰化和磷酸化。FOXO3 进入细胞核后必须经 SIRT1 去乙酰化才能进行基因转录。为什么细胞先要对 FOXO3 进行乙酰化使其入核，然后再对其去乙酰化使其行使功能呢？这看似多余的步骤却恰恰赋予细胞对复杂的信息网络进行精细调节的能力。FOXO3 的乙酰化及去乙酰化分别由不同的蛋白质调控，而这些调节蛋白又分别受其他蛋白质及细胞内环境因素的调控，这就形成了精确、完善的调控网络。

研究还发现 SIR2 通过调控自由基和脂肪代谢过程而影响衰老。我们已经知道，自由基参与了众多生理过程。其中四个方面与 SIR2 的调控作用可能密切相关：自由基产生、自由基清除、自由基对生物体的破坏作用、自由基参与信号转导过程。自由基可以由体内的代谢过程产生，也能够由环境影响（如电离辐射）诱发产生。线粒体与过氧化物酶体是产生自由基重要的细胞器。自由基的清除涉及一系列的酶（如超氧化物歧化酶 SOD、过氧化氢酶 catalase 等）和小分子（如维生素 C、维生素 E、辅酶 Q、谷胱甘肽等）。自由基对生物体的破坏作用涉及对 DNA 的破坏、造成蛋白质的交联、生成脂褐素等老年色素沉积、破坏线粒体等。脂肪代谢与衰老的关系是最近研究的新热点领域。研究已经发现 SIR2 通过与其他蛋白质的相互作用协同影响脂肪代谢过程。同样地，我们可以通过对衰老相关各子系统蛋白质网络的研究，全面探索蛋白质 SIR2 调控脂肪代谢的分子基础。

系统研究蛋白质 SIR2 通过调控自由基和脂肪代谢影响衰老过程的分子机制，有助于解决以下几个方面的科学问题：衰老相关子系统的蛋白质网络的功能模块有哪些？这些功能模块是如何组织的？蛋白质 SIR2 与这些功能模块如何协同作用？总之，这种基于对衰老各相关子系统的全面、系统的研究，将有助于在“共同衰老分子机制”这一框架下认识各种老年相关疾病的病因和病理机制，并进而从全新的视角提出各种老年相关疾病的治疗和预防策略。实现整体论与分析论的统一，既是衰老分子机制研究所要解决的科学问题，也是解决这一科学问题的哲学出发点和战略规划。

参考文献

Ashrafi K ,Chang FY ,Watts JL ,et al. 2003. Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. Nature ,421(6920):268~272

Berdichevsky A ,Guarente L. 2006. A stress response pathway involving sirtuins ,forkheads and 14-3-3 proteins. Cell Cycle ,5(22):2588~2591

Brunet A ,Sweeney LB ,Sturgill JF ,et al. 2004. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. Science ,303(5666):2011~2015

Cohen HY ,Miller C ,Bitterman KJ ,et al. 2004. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. Science ,305(5682):390~392

Dillin A , Crawford DK , Kenyon C. 2002. Timing requirements for insulin/IGF-1 signaling in *C. elegans* Science ,298(5594):830~834

Howitz KT ,Bitterman KJ ,Cohen HY ,et al. 2003. Sinclair ,small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. Nature ,425(6954):191~196

Kenyon C ,Chang J ,Gensch E ,et al. 1993. Tabtiang ,a *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. Nature ,366(6454):461~464

Tissenbaum HA , Guarente L. 2001. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. Nature ,410(6825):227~230

Wang MC ,O'Rourke EJ ,Ruvkun G. 2008. Fat metabolism links germline stem cells and longevity in *C. elegans*. Science ,322(5903):957~960

撰稿人:昌增益　唐　艳　付新苗

北京大学

细菌休眠的生物学意义及分子机制

Molecular Mechanism of Persister Cells

机体休眠（dormancy）是指机体的生命活动处于减缓甚至停滞的非活跃状态，广为人知的如青蛙、熊等动物的冬眠。实际上，休眠在自然界中普遍存在，从细菌、真菌到动物都被发现有不同程度的休眠现象。有科学家甚至大胆地提出，人体也可以进入休眠状态。相比较而言，细菌的休眠仅被少数专业人员研究，但是，研究细菌休眠的难度和意义却不亚于研究动物休眠，了解其分子机制也是治疗许多细菌感染性疾病的关键，例如由结核杆菌引起的肺结核。

细菌的休眠现象最早由 Joseph Bigger 在 1944 年发现。细菌群落中总有一些生长迟滞的细胞能够在胁迫环境下（如抗生素作用）持续生存，这类具有抗生素抗性不进行分裂的细胞被称为休眠细胞。一般来说，休眠细菌和非休眠细菌的遗传背景是相同的，但是由于其他众多因素的作用，两者完全处于不同的代谢和生长状态。实验室中的休眠细菌常指不进行增殖的培养细菌。将细菌从培养基上取下，在低温下悬浮于中性盐的稀溶液或缓冲液中，其只进行微弱的内源代谢并不进行分裂，但可以长时间存活，因此可以近似认为它们是休眠细菌。

关于休眠细菌的形成机制和鉴定方法的研究方兴未艾。已发现多个菌种休眠细胞的后代并没有表现出不同于原始菌种的抗性和敏感性，这说明休眠细胞不存在遗传特性。细菌休眠细胞不是基因突变产生的，但明显受到多基因表达调控的控制，包括 DksA、SsrS、YgfA、DnaKJ、HupAB、IhfAB 等。细菌休眠也可能是一个表观遗传现象，去甲基化使某些基因有新的表达，因此特定 DNA 的去甲基化修饰作用可能与休眠现象的形成有关。休眠细胞与正常菌群的生长曲线不同，但休眠细胞和正常细胞在迟缓期（lag phase）的最初生长率都是相同的。休眠细胞转入正常生长后，即在稳定期（stationary phase）之后而不是在稳定期产生抗性作用。因此，从稳定期取出后至休眠细胞没有完全形成的这一阶段，应是实施药物灭菌的最佳时期。

深入研究表明细菌休眠现象成为肺结核等疾病治疗的主要难题。在抗生素作用初期，菌群中绝大多数细胞被杀死，几个小时后死亡率明显降低，表明存在一定数量耐受性强的休眠细胞。因此，当免疫系统和抗生素失效时，休眠的病菌随时可以重新繁殖，从而引发新的感染。一般认为，在暴露于抗生素之前，休眠细胞就已经存在于菌群中，即普通菌群中都有休眠细胞存在。休眠细胞的抗药性源于其在抗生素介入前便处于休眠状态，因此，它们对抗生素基本没有反应，这类

休眠细菌的鉴定是相关疾病治疗的瓶颈所在。

在相同的遗传背景和相同的环境条件下，休眠细胞表现出不同的生命活动，意味着其在进化进程中的特殊意义。由于休眠细菌能适应恶劣的环境，例如干旱、盐碱、极端气温、营养缺乏等。因此，在进化上，细菌的休眠可能是细菌适应环境变化继续生存的重要手段。一方面，当恶劣环境恢复正常之后，存活下来的休眠细菌可以重新繁殖；另一方面，存活的休眠细菌可以发生遗传变异，从而帮助菌种适应新的环境。细菌休眠与环境的高度相关性又表现着不可预期的生态学意义。一方面，揭示环境生态因子对休眠细菌的量-效关系，可以深刻理解休眠细菌在菌群中的生活型和生态位。另一方面，研究细菌的休眠状态及其在菌落中的变化趋势，也可以了解生态环境的友好程度。

最后要强调的是，细菌休眠的研究对了解动物细胞休眠的机制具有一定的借鉴意义。与细菌休眠类似的是，动物细胞休眠后可抵御外界各种有害因子，但不同的是，动物个体可以通过启动细胞休眠来延缓个体的衰老，这个特性具有一定的医学意义，那就是对于现今无法治疗的某些疾病可以通过启动细胞或个体休眠来控制病情，以留待他日解决。已有研究表明淋巴细胞（尤其是 T 细胞）储存在零下 100 ℃时处于休眠状态，如果能启动淋巴瘤细胞进入休眠状态，那么就可以控制病情的恶化。

总的来说，细菌休眠的研究具有重要的生物学意义，包括生命的进化、生态环境的变化和疾病的治疗等多个领域。揭示此类特殊生命现象的分子机制需要综合利用遗传学、生物化学、分子生物学、生物信息学等各个学科的技术手段才能实现，有许多重要的问题等待科学家去探索和回答。

参 考 文 献

Balaban NQ，Merrin J，Chait R，et al. 2004. Bacterial persistence as a phenotypic switch. Science，305：1622～1625

Bigger JW. 1994. Treatment of staphylococcal infections with penicillin. Lancet，10：497～500

Gefen O，Gabay C，Mumcuoglu M，et al. 2008. Single-cell protein induction dynamics reveals a period of vulnerability to antibiotics in persister bacteria. PNAS，105：6145～6149

Levin BR，Rozen DE. 2006. Non-inherited antibiotic resistance. Nat Rev Microbiol，4：556～562

Lewis K. 2007. Persister cells，dormancy and infectious disease. Nat Rev Microbiol，5：48～56

Shah D. 2006. Persisters：a distinct physiological state of *E. coli* BMC Microbiol，6：53～61

Spudich JL，Koshland DE. 1976. Non-genetic individuality-chance in single cell. Nature，262：467～471

Stewart GR，Robertson BD，Young BD. 2003. Tuberculosis：a problem with persistence. Nat Rev，1：97～105

撰稿人：昌增益　王云彪

北京大学

人类牙齿器官的再生

Regeneration of Human Tooth

1. 背景

人类的牙齿是人体组织器官中，结构最复杂、精细，形态多样并具左右对称性，既有人体最硬的牙釉质组织，也有最软的牙髓组织，由软、硬组织共同构成的由内至外梯度有序的复杂器官。牙齿的形态、结构、发育过程受多种基因调控，但至今机制不明。牙齿的牙釉质组织非常坚硬，但常因龋病、牙周病等常见口腔疾病导致牙齿或牙列缺失。牙齿缺失及其相关疾病不仅影响咀嚼、美观、发音等基本功能，而且直接或间接地影响消化系统、心血管系统等组织器官的健康。同时，老年人牙齿缺失常常表现出记忆力减弱现象，因此牙齿缺失也可影响大脑神经系统，也是人类衰老的重要标志之一。

人类的牙齿在人的一生中经历乳牙列、恒牙列两个阶段。自人类诞生以来，在恒牙列阶段，牙齿一旦缺损或缺失，未观察到自然再生的现象。然而，部分低等动物牙齿脱落后可反复再生。人类在低等动物身上观察到的牙齿再生现象，让人类不再满足于采用树脂、陶瓷、金属材料等修复缺失的牙齿器官的现状，激发了人们探索人类牙齿缺失后再生修复的强力欲望。

2. 科学意义

随着21世纪人类在干细胞技术、组织工程技术领域研究的不断深入发展，牙齿再生的研究受到众多科学家、临床医生、牙齿缺失患者的高度关注。美国、日本、德国等发达国家，以及中国的研究人员投入大量的人力、物力进行相关研究，但至今仍停留在基础研究及动物实验阶段。

牙齿再生的研究涉及发育生物学、组织工程学、材料科学、口腔医学等多学科的交叉，涉及细胞分离与培养技术、组织器官重建技术、基因工程技术、蛋白质组学技术、材料合成与三维支架制备技术等多种技术的综合或混搭应用和创新。牙齿再生研究的策略首先是要在掌握牙齿发生、发育的分子生物学机制的基础上，利用干细胞技术、组织工程技术，在体外构建组织工程牙胚或在体内直接构建组织工程牙，通过系列动物实验研究，最终实现人类牙齿再生的研究和应用。因此，通过针对牙齿发生、发育过程中上皮-间充质细胞相互作用机制的研究，可发现新的关键调控基因及通路；通过对适合于人类牙再生的新的种子细胞来源及其牙向诱导分化体系的研究，以及牙再生微环境的研究、牙齿三维支架材

料及支架制备的研究，不仅可为建立牙再生新的理论和新的技术提供科学依据，推动相关学科的发展，而且可为探索人类组织器官的生物修复方法奠定基础，因此具有非常重要的科学意义。

3. 最新进展

近年来，科学家们在牙齿的发生发育分子机制、组织工程牙胚、组织工程牙根，以及组织工程牙釉质、牙本质、牙骨质、牙本质牙髓复合体、牙周膜等方面取得了一定进展，主要的进展在下述三个方面：

（1）在牙齿发生、发育的分子机制方面：上皮细胞、间充质细胞及其相互作用是牙齿发生、发育的基础，牙齿发生发育的过程受多种基因和信号通路的调控。至今，大量实验研究已发现有300多种基因参与牙齿发生发育的调控过程，对牙齿的类型、数目、大小、形貌、结构及发育过程进行调控，而且是多基因的、相互关联的综合、系统调控；发现BMP、FGF、SHH、WNT配体及其受体为牙齿发育、介导上皮细胞和间充质细胞相互作用的四种关键信号通路。这些研究结果有助于了解大自然是如何制造出一颗牙齿的，为进一步深入研究牙齿发生发育的分子机制奠定了坚实的基础。

（2）在牙胚“种植”再生修复牙齿的研究方面：天然的牙胚组织由上皮细胞和间充质细胞构成，在牙槽骨微环境下发育成具有牙冠和牙根的牙器官并从牙槽骨中萌出，牙冠萌出牙槽骨外，而牙根仍在牙槽骨内。牙胚“种植”是试图将在体外构建的组织工程化人工牙胚“种植”到牙槽骨内实现牙齿再生的方法。它是利用组织分离采集的自体干细胞，经体外诱导分化为成釉细胞、成牙本质细胞、牙骨质细胞、牙髓细胞等，在体外构建的牙胚发育微环境中培育成人工牙胚，然后将牙胚植入牙槽骨内，在牙槽骨天然微环境下发育形成牙齿，并自然萌出修复缺失的牙齿。这方面的研究进展涉及的有关实验证实帽状期牙胚是牙胚移植的最佳时期；证实将猪不同时期的牙胚组织单细胞悬液复合到可降解聚乳酸聚乙醇酸支架材料上，再移植到免疫缺陷的大鼠大网膜内培养，可观察到发育正常的牙胚形成，牙胚组织中的成釉细胞和成牙本质细胞分化良好，排列整齐；证实将鼠口腔上皮与胚胎干细胞、成体骨髓来源的细胞分别重组后移植入鼠体内，观察到二者均可分化为成牙本质细胞，并形成牙齿样结构，表明成体非牙源性间充质干细胞在口腔上皮的诱导下，能够分化为牙源性细胞，并形成牙齿组织，因而具有成牙能力。

（3）在生物牙根再生修复牙齿的研究方面：天然发育成形的人类牙根在组织结构上是包含牙髓、牙本质、牙骨质、牙周膜组织的复合体，在形态上具有单根、双根、三根、四根等多种形态。有关学者利用组织工程技术，试图通过成体细胞或干细胞、三维组织支架材料、信号转导分子，在体内构建具有正常形态、大小和组织与生理解剖结构的牙根——组织工程牙根，又称生物牙根。将牙根植

入缺失牙的牙槽骨内，再在生物牙根的基础上采用传统牙冠修复方法修复失牙。这方面的研究取得了一定进展，研究证实，牙髓干细胞、根端牙乳头细胞、人脱落乳牙干细胞、牙周膜干细胞、牙囊干细胞及骨髓基质干细胞等均可作为种子细胞，在大鼠体内分别再生出牙髓牙本质样结构及牙周膜样组织。可降解的聚乳酸、聚乙醇酸及其复合材料，合成的细胞外基质材料，以及经过处理的不降解的牙本质材料均可作为支架材料，制备成形状可控的三维生物牙根支架。重组人骨形成蛋白、转化生长因子，胰岛素样生长因子等可作为细胞诱导生长因子、发育期根端复合体及其与周围组织可作为牙根牙周发育的微环境。

4. 主要难点

（1）从发育生物学角度，研究牙齿发生、发育的分子机制，对牙齿再生研究具有非常重要的意义。但是，至今对——牙齿发育过程中上皮细胞与间充质细胞是如何相互作用的；牙齿发生、发育的基因众多，其关键基因有哪些；这些关键基因又是通过哪些信号通路并如何发挥作用的；牙胚要发育成牙齿，其最佳的成牙微环境是什么——这些问题还不明了。

（2）从组织工程学角度，适合的种子细胞来源及在组织工程环境下的成牙分化机制，对构建组织工程牙胚或牙根、实现牙齿再生非常关键。便于取材的成体干细胞，将成为替代牙胚中的上皮细胞和间充质细胞的种子细胞。该成体干细胞如何在组织工程牙微环境下分化成上皮细胞和间充质细胞，最终这些细胞相互作用并发生、发育成组织工程牙胚或组织工程牙根？

（3）需要适合人类牙齿再生的微环境，如天然的牙周膜、牙槽骨组织及其三维结构环境。如何利用组织工程的原理，构建仿真的适合人类牙齿再生的微环境，包括具有一定形态的三维可降解生物材料支架，能调控成体干细胞分化诱导各种牙齿组织并形成独特牙齿结构、形态的调控因子，能提供微循环及营养的血供系统，能提供感觉支配的末梢神经系统等？

5. 展望

在牙齿发生发育的分子机制方面，牙齿的生长发育包含一系列复杂而精细的调控过程，涉及对牙齿大小、发生位置、形态结构及数量等的调控。研究发现很多生物分子组成的复杂信号网络参与其中，多达300种基因在牙齿发生、发育中表达，而且这些信号分子和转录因子在牙齿发生、发育的不同时空重复出现而又产生不同的作用。因此，很难从单一基因的角度完成对牙齿发生发育分子机制的探索，需要从组学的角度，即基因组乃至蛋白质组学的水平研究牙齿发生发育的分子机制，或需要从系统生物学的角度研究牙齿发生发育的分子机制。

在人工牙胚的研究方面，已证实帽状期牙胚含有形成成体牙齿的所有细胞和相关因子，以及具有诱导形成血管和神经的能力，因此帽状期牙胚是牙胚植入移植的最佳时期。证实成体牙源性上皮细胞、成体非牙源性间充质干细胞、牙源性间充

质干细胞体外增殖后重组，在合适的诱导条件下可形成具有一定形状和大小的牙胚。因此，选择适合的来源丰富的成体细胞或干细胞作为种子细胞来源，仿真牙槽骨内牙胚发生发育的微环境，在体外构建适合干细胞分化诱导的牙胚三维支架及细胞生长发育的微环境，在体外培育牙胚发育至帽状期。进一步研究在植入体内后，控制牙齿发育在不同部位形成不同解剖形态和具有天然牙齿结构的牙齿 。

在生物牙根的研究方面，已证实同时使用根端牙乳头细胞和牙周膜干细胞，可在小型猪上再生出具有牙本质结构及牙周膜结构，且能支持陶瓷牙冠修复的生物牙根。因此，可在前人已获得的研究成果的基础上，仿天然牙根组织结构，利用可降解的生物材料构建一种具有形状可控，并可生物矿化形成稳定的牙根形态的三维牙根支架。支架具备血管、神经长入的空间，同时可修饰不同的生长因子等，使三维牙根支架拥有能诱导种子细胞分化构成牙根不同组织细胞的微环境。支架的内外侧形貌结构不同，内侧有利于形成牙髓牙本质复合体样结构，外侧有利于形成牙骨质及连接牙骨质与牙槽骨的牙周膜样结构。

总之，作为期望在人类应用的技术，牙齿再生的研究还会面临其他很多可预见的和不可预见的问题。解决这些问题，需要多学科交叉，需要团队合作，联合攻关，从研究方法、技术手段方面综合与深化，以期在不久的将来实现人类这一梦想 。

参考文献

金岩，郭维华. 2010. 生物牙根研究进展. 现代口腔医学杂志，24(1)：1～4

王翰章. 2001. 中华口腔科学. 北京：人民卫生出版社

Guo W, He Y, Zhang X, et al. 2009. The use of dentin matrix scaffold and dental follicle cells for dentin regeneration. Biomaterials, 30(35)：6708～6723

Honda MJ, Shuhei Tsuchiya, Yoshinori Shinohara, et al. 2010. Recent advances in engineering of tooth and tooth structures using postnatal dental cells. Japanese Dental Science Review, 46, 54～66

Honda MJ, Tsuchiya S, Sumita Y, et al. 2007. The sequential seeding of epithelial and mesenchymal cells for tissue-engineered tooth regeneration. Biomaterials, 28(4)：680～689

Koussoulakou DS, Margaritis LH, Koussoulakos SL, 2009. A curriculum vitae of teeth: evolution, generation, regeneration. Int J Biol Sci, 5(3)：226～243

Marianna Bei. 2009. Molecular genetics of tooth development. Current Opinion in Genetics & Development, 19：504～510

Snead ML. 2008. Whole-tooth regeneration: it takes a village of scientists, clinicians, and patients. J Dent Educ, 72(8)：903～911

撰稿人：魏世成
北京大学

糖蛋白上糖链的功能

The Function of Glycan on Glycoprotein

1. 背景

糖蛋白（glycoprotein）是一类重要的糖缀合物，由蛋白质和聚糖两部分组成。已知体内的蛋白质有 1/3 以上为糖蛋白。对糖蛋白的研究至今已有 100 多年的历史，开始时并不怎么引起人们的注意，对糖蛋白中聚糖的功能所知甚少。近年来，随着糖蛋白化学研究方法的发展，人们开始逐渐意识到糖蛋白上糖链部分具有重要的生理学和病理学功能，认识到糖链不仅能影响到蛋白质部分的构象和聚合，而且还参与糖蛋白的相互识别和结合等，这些作用是蛋白质和核酸不能取代的。因此，糖链被认为是继蛋白质肽链、核酸链之后的第三类大分子的生命链。

2. 科学意义

虽然目前人们已经了解到了糖链的一些功能，但是由于糖链本身结构的复杂性和多样性，以及糖链分析手段的局限性，使得对糖的研究工作非常困难。目前有关糖的研究仍然落后于蛋白质和核酸的研究水平，因此对糖蛋白上糖链所发挥的功能阐明得仍然不够全面。如果说人类基因组计划使我们了解到了基因图谱等许多信息，那么对糖链的研究不仅可揭示基因功能等生命本质，还将阐明更多疾病发生机制。因此，对糖链结构与功能的解析至关重要。研究糖蛋白上糖链的功能将是后基因组时代生命科学研究的核心内容之一，对维护人类的健康和疾病的防治及诊断将产生深远的影响。糖链蕴涵着许多生命的奥秘，巨大的研究空间和无数未知领域亟待我们探索和研究。

3. 最新进展

近年研究表明，糖蛋白上的糖链除了在一些基本的生命过程中，如受精、发生、发育、分化、神经系统、免疫系统稳态的维持方面发挥重要作用，还参与疾病的发生和发展，如炎症及自身免疫疾病、癌细胞异常增殖与转移、病原体感染、植物与病原菌相互作用等。糖链在这些生命和疾病过程中起特异性的识别和介导作用。研究表明，糖链的异常表达或结构改变均会影响到肿瘤细胞的生物学行为。例如，β1,6 GlcNAc 分支延长和增多，唾液酸数量改变，核心岩藻糖或外链岩藻糖数量增多等。在上述结构变化中，最常见的是细胞表面 β1,6 分支糖链的变化，β1,6 分支的修饰可激活 EGFR 和 Scr 信号转导通路，促进肿瘤侵袭

和转移。β1,6 分支增多是 *N*-乙酰氨基葡萄糖转移酶Ⅴ（GnT-Ⅴ）表达增高及活性增强的结果。GnT-Ⅴ的过表达可使肿瘤细胞表面形成过量的 β1,6 分支，进而产生多天线的 *N*-糖链结构，从而改变糖蛋白分子的生物学性状，增强肿瘤细胞的侵袭和转移能力。此外，唾液酸是带负电荷的九碳糖，存在于糖蛋白与糖脂的寡糖链末端。因为它在糖链中的末端定位性和带负电荷性，糖链的唾液酸修饰在细胞中发挥重要作用。肿瘤细胞中糖链的唾液酸化修饰增多可增强细胞与胶原蛋白Ⅵ（基底膜成分）的黏附，减少同质细胞之间的黏附，增强细胞侵袭能力。在对 *O*-糖基转移酶 GALNT14 的研究中发现，肿瘤细胞中常出现该酶的表达异常，可改变死亡受体 4 和死亡受体 5 的 *O*-糖基化的表达，从而降低肿瘤细胞的凋亡信号。可见，糖链在肿瘤增殖、迁移、侵袭、免疫逃逸等过程中起到重要的作用。此外，近年随着糖链生物学功能的研究，多种糖链相关药物正在开发，有些已走向临床。

4. 主要难点

目前对糖蛋白上糖链功能的研究困难在于：①糖链本身的结构要比核酸和蛋白质序列复杂得多。比如由三个氨基酸组成的直链分子有六种可能的序列，而由三个单糖所构成的三聚糖，其可能的序列则达上千种，这是因为糖链分子是分支的，而且单糖间的连接有 α 和 β 两种立体构型。②糖链具有微观不均一性。对于同一种蛋白质来说，在不同组织和细胞上的分布会使其糖基化程度不同，即糖链结构具有差异性。因此，从生物材料中很难获得组分均一、结构明确的糖链，这就限制了糖链功能的研究。③糖链的生物合成调控具有复杂性。糖链的合成不是经模板复制，而是受到糖基转移酶和糖苷酶等基因表达的精细调控，此外还受到酶活性的影响。④糖蛋白上糖链的功能具有时间和空间性。如在个体发育的不同阶段，蛋白质上的糖链可以发生变化，其相应的功能也随之改变。对同一糖链来说，由于作用的靶蛋白分子不同，其发挥的功能也有所不同。

5. 展望

目前要解决的关键问题仍然是糖链结构分析和合成方法的建立。毫无疑问，只有在方法学上有所突破，为糖链的功能研究提供强有力的技术支持，才能在功能研究上获得更多的基础数据。未来在糖链功能研究上，主要还是研究糖链合成与代谢途径及糖链在细胞内、细胞间的一些功能。此外，应该弄清糖链中每个糖基的功能。蛋白质与糖链的相互作用将成为其前沿领域，相信随着糖链结构测定和糖链合成等关键技术的发展，糖链更多的功能将被揭示。全面阐明糖链结构与功能的关系，研究和开发新药，使糖工程真正走向产业化。

参 考 文 献

Dennis JW, Granovsky M, Warren CE. 1999. Protein glycosylation in development and disease. Bioessays,

21(5): 412～421

Helenius A, Aebi M. 2001. Intracellular functions of N-linked glycans. Science, 291(5512): 2364～2369

Inamori K, Gu J, Ohira M, et al. 2006. High expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in favorable neuroblastomas: involvement of its effect onapoptosis. FEBS Lett, 580(2): 627～632

Lau KS, Partridge EA, Grigorian A, et al. 2007. Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation. Cell, 129(1): 123～634

Raman R, Raguram S, Venkataraman G, et al. Glycomics: an integrated systems approach to structure-function relationships of glycans. Nat Methods, 2(11): 817～824

Wagner KW, Punnoose EA, Januario T, et al. 2007. Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. Nat Med, 13(9): 1070～1077

Zhao YY, Takahashi M, Gu JG, et al. 2008. Functional roles of N-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer. Cancer Sci, 99(7): 1304～1310

撰稿人:张嘉宁　汪淑晶

大连医科大学

病原体传染的种属屏障的分子基础是什么

What Is the Molecular Basis of Species Barrier on Pathogen's Infection

病原体传染的种属屏障是指与在同一种属间进行传播相比，病原体很难在不同种属间进行传播（或即使传播，其难度也极大，所需致病因子量大大增加，潜伏期大大延长）。种属屏障作为一种天然的屏障系统，它有效地关闭了疾病传播的“通道”，防止病原体在不同宿主间的广泛传播。这个通道在一定范围内是不能打破的，一旦有病原体突破了屏障，人类往往面临巨大的灾难（例如，2002～2003 年暴发的 SARS，造成了全世界的广泛传播）。然而，从另一个角度而言，种属屏障的存在也让许多病原微生物的研究遭遇困境。许多人类病原微生物无法感染常规的实验动物，研究者无法制备病原微生物的动物感染模型，对病原微生物的致病性无法深入研究。因此，这道无形屏障的组成及其所涵盖的具体分子机制，理所当然地成了研究者关注的焦点。然而，时至今日这一问题仍未完全解决。

目前，已初步揭示了一些种属屏障机制，这些机制就其本质而言，均为病原体与宿主间的相互作用。这些机制包括宿主细胞表面受体、宿主细胞表面的多态性、宿主胞内复杂的机制、宿主的天然免疫系统和获得性免疫系统。此外，还涵盖了病原体的定植与侵袭、病原体毒素蛋白的表达，病原体对宿主的修饰和改变等。病原微生物和其宿主可能需要多年的进化才能建立起稳定的种属关系，而要跨越这一种属关系，病原微生物必须对新宿主单一组织、单一个体甚至群体的多种屏障分子和屏障机制“重新编程”，从而适应并定植于新宿主。

以病毒为例，病毒是一种结构简单的严格细胞内寄生物，具有较强的种属特异性。病毒与宿主细胞表面受体结合后，通过内吞作用进入宿主细胞，利用宿主细胞内的某些蛋白质因子完成其一系列复制、转录过程，并引起宿主细胞信号转导途径的变化，导致宿主细胞裂解、凋亡，或使病毒处于隐性潜伏感染状态。病毒作为宿主细胞的外来异物，一方面，宿主表现出对病毒感染的主动限制作用，保护宿主细胞免受病毒的侵犯。宿主对病毒产生的第一道特异性屏障就是细胞表面受体，特异性受体决定特异性病毒的入侵。以 SARS 冠状病毒（SARS coronavirus，SARS CoV）为例，该病毒通常只在蝙蝠等宿主局域性循环传播，但也可通过病毒表面的 S 蛋白结合至加压素-转化酶 2（angitensin-converting enzyme 2，

ACE2）而感染喜马拉雅掌灵猫（花面狸）。ACE2 在人类和灵猫间高度保守，若 SARS CoV 的 S 蛋白发生突变，S 蛋白就可结合至人类的 ACE2 上从而感染人类细胞，这就是造成 2002～2003 年 SARS CoV 全球暴发性流行的原因。再有，哺乳动物流感病毒和禽类流感病毒都是结合至不同宿主呼吸道细胞表面的唾液酸和聚糖链，因而流感病毒的微小突变都可能造成病毒在不同宿主之间的传播。宿主对病毒的第二道屏障则在于宿主细胞内部的限制机制。例如 APOBEG-3G、3F 蛋白和相关的胞二磷胆碱脱氨基酶可以阻断逆转录病毒从一个细胞向另一个细胞感染；TRIM5α 分子则可以结合胞内的病毒颗粒，阻止病毒脱壳等进一步的感染；值得一提的还有干扰素的作用，例如鼠诺罗病毒（murine norovirus）具有广泛的细胞结合能力，但是在进入细胞后可被干扰素阻断，病毒将不能在胞内复制和增殖。另一方面，病毒会主动地对宿主细胞的重要生命活动以及某些蛋白质因子进行修饰，使宿主细胞能为病毒感染和复制提供必需的场所、物质和能量。病毒感染宿主细胞后，通过影响和干扰宿主细胞转录组和蛋白质组的稳态，以及相应的基因网络和蛋白质网络平衡引起宿主细胞和机体正常生理功能的改变，从而决定了病毒的感染性、致病性和免疫状态。但是，目前关于人类的主要致病性病毒（如 HIV、流感病毒和埃博拉病毒等），由于理论和技术上的限制，对病毒如何对宿主细胞屏障分子重新调试的机制尚未取得实质性突破。

细菌作为另一种重要的病原微生物，其种属特异性主要体现在定植与侵袭宿主、特异性毒素的表达以及突破宿主的免疫系统的能力上。细菌进入宿主后，可通过细菌表面的一些大分子结构成分（如革兰阴性菌的菌毛、革兰阳性菌的脂磷壁酸等）黏附在宿主消化道、呼吸道、生殖道、尿道及眼结膜等处，然后与宿主细胞或组织表面相应的受体结合，从而黏附于细胞或组织表面，再通过抗吞噬、抗体液免疫、内化作用及在体扩散等机制逃避宿主的免疫机制，最终形成感染或致病。例如致病性肺炎链球菌利用表面的黏着素与人类上皮细胞相互作用，紧贴于鼻咽上皮和肺泡上皮细胞，该菌外膜上的多糖荚膜可抵抗机体的吞噬作用。在宿主免疫系统作用下，肺炎链球菌还可分泌 IgA1 分解酶破坏 IgA，从而逃避宿主的免疫作用并定植于宿主器官。病原细菌正是具有了不同的定植力、侵袭力和抗宿主免疫系统能力，从而决定了它在不同宿主的感染特性。

目前，对病原体传染的种属屏障的分子机制虽有一些了解，但总体来说尚不清楚。其主要原因在于生物体相互作用的复杂性，特别是病原体进入宿主后，与宿主细胞复杂的相互作用。此外，对于病原体与宿主间相互适应的进化过程知之甚少也是一个重要原因。因此，探寻统一的种属屏障的分子机制存在相当大的难度，然而，针对特定的病原体，通过深入探讨病原体对宿主细胞的修饰与改变机制、病原体与宿主免疫系统的相互关系、病原体自身的遗传变化和传播途径等，有望为现阶段种属屏障分子机制的研究提供新的线索。

参考文献

贾文祥. 2005. 医学微生物学. 北京:人民卫生出版社,65～68,71

Collinge J, Clarke AR. 2007. A general model of prion strains and their pathogenicity. Science, 318(5852):930～936

Parrish CR, Holmes EC, Morens DM, et al. 2008. Cross-species virus transmission and the emergence of new epidemic diseases. Microbiol Mol Biol Rev, 72(3):457～470

Peiris JS, de Jong MD, Guan Y. 2007. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. Clin Microbiol Rev, 20(2):243～267

Randall RE, Goodbourn S. 2008. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. J Gen Virol, 89(Pt 1):1～47

Windl O, Buchholz M, Neubauer A, et al. 2005. Breaking an absolute species barrier: transgenic mice expressing the mink PrP gene are susceptible to transmissible mink encephalopathy. J Virol, 79(23):14971～14975

Zhao GP. 2007. SARS molecular epidemiology: a Chinese fairy tale of controlling an emerging zoonotic disease in the genomics era. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 362(1482):1063～1081

撰稿人:何凤田
第三军医大学

流感病毒是如何发生遗传变异和实现跨种传播的

How Does Influenza Virus Make Genetic Variations and Get Cross-Species Transmissions

流行性感冒病毒简称流感病毒，是造成人或动物急性上呼吸道感染、导致流行性感冒的 RNA 病毒。流行性感冒传染性强、传播速度快，免疫力较弱的老人或儿童及一些免疫失调的患者会出现较严重的症状，如肺炎或心肺功能衰竭等。流行性感冒常暴发周期性的大流行，给世界各国人民造成极大的经济和生命损失。自 20 世纪以来，人们对流感病毒的研究就从未停止过，流感病毒如何发生遗传变异、如何实现跨种传播一直是专家们关注的焦点。

在分类学上，流感病毒属于正黏液病毒科。根据流感病毒感染的对象，可以将流感病毒分为人类流感病毒、猪流感病毒、马流感病毒及禽流感病毒等类群。其中，人类流感病毒根据其核蛋白的抗原性可以分为三类：甲型流感病毒，又称 A 型流感病毒（influenza A virus）；乙型流感病毒，又称 B 型流感病毒（influenza B virus）；丙型流感病毒，又称 C 型流感病毒（influenza C virus）。在过去 100 年中，导致流感大流行的三个新流感株都属于流感病毒 A 型，而 B 和 C 型流感只感染人类但从未引起流行。

流感病毒结构自外而内可分为包膜、基质蛋白及核心三部分，可以根据表面的不同蛋白质分为不同亚型。一种蛋白质是血细胞凝集素（HA），至少有 15 种亚型，帮助病毒进入宿主细胞；另一种是神经氨酸酶（NA），有 9 种亚型，能够破坏细胞的受体，使病毒在宿主体内自由传播。甲型流感病毒就由 H 型和 N 型进行排列组合而成，例如 H1N1、H5N1。H 亚型已经发现了 16 种，理论上甲型流感有 144 种亚型病毒。通常感染禽类的有 H5、H7 和 H9 等，感染人类和猪的一般是 H1、H2 和 H3 等。

在感染人类的三种流感病毒中，甲型流感病毒有着极强的变异性，乙型流感病毒次之，而丙型流感病毒的抗原性则比较稳定。甲型流感病毒的遗传物质包括八个独立的 RNA 片段，能轻易地进化和交换基因。为了复制自己，流感病毒进入到细胞后霸占细胞的蛋白质和病毒 RNA 加工体系，使其制造新的病毒蛋白质和病毒 RNA 拷贝。然后这些片段组装成新的病毒，并脱离宿主细胞，继续感染其他宿主细胞。因为没有校正机制去保证病毒 RNA 拷贝的准确性，所以病毒 RNA 在复制过程中常会发生新的突变。如果两种不同的流感病毒感染同一细胞，

它们的 RNA 片段能够在那里自由组合，产生包含有两个原始病毒基因相结合的后代病毒——这是病毒基因再聚合时产生多种病毒新株的重要机制。

甲型流感病毒变异频繁，每隔十几年就会发生一个抗原性大变异，产生一个新的毒株，这种变化称为抗原转变，亦称抗原的质变。在甲型流感亚型内还会发生抗原的小变异，其表现形式主要是抗原氨基酸序列的点突变，称为抗原漂移，亦称抗原的量变。抗原转变可能是血凝素抗原和神经氨酸酶抗原同时转变，称为大族变异；也可能仅是血凝素抗原变异，而神经氨酸酶抗原则不发生变化或仅发生小变异，称为亚型变异。乙型流感病毒的变异会产生新的主流毒株，但是新毒株与旧毒株之间存在交叉免疫，即针对旧毒株的免疫反应对新毒株依然有效。

对于甲型流感病毒如何发生遗传变异，学术界尚无统一认识。有些学者认为，由于人群中传播的甲型流感病毒面临较大的免疫压力，促使病毒核酸不断发生突变；另一些学者则认为，由于人甲型流感病毒和禽流感病毒同时感染猪后发生基因重组导致病毒的变异。后一观点得到了一些事实的支持，研究工作表明，1957 年流行的亚洲流感病毒（H2N2）基因的八个节段中有三个是来自鸭流感病毒，而其余五个节段则来自 H1N1 人流感病毒。甲型流感病毒的高变异性增大了人类应对流行性感冒的难度，使人们无法准确预测即将流行的病毒亚型，难以有针对性地进行预防性疫苗接种。另外，甲型流感病毒每隔十几年就会发生抗原转变，产生现有疫苗难以对付的新流感毒株。

美国华盛顿军事病理学院分子病理学家杰弗里 · 陶贝格尔（Jeffery K Taubenberger）等刊登在《Science》和《Nature》上的研究成果显示，1918 年流行的流感病毒的八个基因片段与禽流感病毒的关系更为密切，而同一种遗传突变类型在当前亚洲流行的禽流感病毒中也有所发现。说明禽流感病毒能够引起严重的人类流感传染病，而不用先同人类已经感染的病毒相结合。因此，Taubenberger 将 1918 年流感病毒称为“所有大流感之母”，并且可能与 1957 年亚洲 H2N2 流感病毒、1968 年香港 H3N2 流感病毒和 1977 年俄国 H1N1 亚型流感病毒有着千丝万缕的联系。

流感病毒可以突破种属屏障，引起禽类、人类或其他哺乳动物感染，实现跨种传播。例如，流感病毒在猪体内发生重组和变异是流感病毒的跨种传播与变异极为危险的结果。猪的呼吸道上皮细胞同时具有人流感病毒和禽流感病毒的受体，既是禽、猪、人流感病毒共同的易感宿主，也是流感病毒通过基因重组产生新流行毒株的“混合器”以及古老流感病毒长期存在的“贮存器”，由此奠定了猪在流感病毒种间传播链中重要的中间宿主地位。此外，猪流感病毒的 H 受体（血细胞凝集素）结合位点具有与禽、人两种流感病毒受体相结合的特性，决定了猪流感病毒不仅可以感染猪，同时也具有感染禽类与人类的能力。

美国圣路易斯大学传染病和免疫学教授罗伯特 · 伯尔希（Robert B Belshe）

发表的《流感大流行的起源》一文中指出，1957 年人类和其他动物感染的流感病毒包含了一种禽类 H2N2 流感病毒和一种人类 H1N1 流感病毒的遗传基因。1957 年的流行株是二源重组病毒，它的 PB1（多聚酶蛋白）、HA、NA 基因来自于禽流感病毒，其他 5 个基因片段来自于当时流行于人群中的 H1N1 亚型流感病毒。

流感病毒变异是永恒的，肯定会发生变异和再变异；变异可以说有规律，也可以说没有规律。此外，目前科学家对 1918 年流感病毒如何感染人还没有定论，究竟是“禽—人”直接的跨种传播，还是经历“禽—猪—人”的种间适应传播，还不得而知。流感病毒是如何发生遗传变异和实现跨种传播的问题是目前病毒学研究的新难题，也是人类需要加倍努力去揭开的谜。

参考文献

Belshe RB. 2005. The origins of pandemic influenza—lessons from the 1918 virus. N Engl J Med , 353(21):2209～2211

Biswas SK , Boutz PL , Nayak DP. 1998. Influenza virus nucleoprotein interactswith influenza virus polymerase proteins. J Virol ,72 :5493～5501

Chen W , Calvo PA , Malide D ,et al. 2001. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. Nat Med ,7 :1306～1312

Duan L , BagasraO , Laughlin MA ,et al. 1994. Potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by an intracellular anti-Rev singlechain antibody. Proc Natl Acad Sci USA , 91 :5075～5092

Hoft DF , Belshe RB. 2004. The genetic archaeology of influenza. N Engl J Med ,351(24):2550～2551

Holmes EC , Taubenberger JK , Grenfell BT. 2005. Heading off an influenza pandemic. Science , 309(5737):989

Layne SP ,Monto AS ,Taubenberger JK. 2009. Pandemic influenza : an inconvenient mutation. Science , 323(5921):1560～1561

Rambaut A , Pybus OG , Nelson MI ,et al. 2008. The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus. Nature , 453(7195):615～619

Tumpey TM , Basler CF, Aguilar PV ,et al. 2005. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. Science ,310(5745):77～80

撰稿人:吴建国

武汉大学

乙肝病毒的特异性细胞受体到底是什么

What Is the Specific Cell Receptor of Hepatitis B Virus

乙型肝炎病毒（hepatitis B virus，HBV；以下简称乙肝病毒）感染是当前严重影响全球健康的问题之一，人类至今仍缺乏对慢性乙型肝炎有效的控制手段和彻底的治愈方案。导致这种局面的原因有多种，主要原因包括人类迄今为止仍未发现乙肝病毒的特异性细胞受体。通常病毒与细胞受体的结合是病毒感染宿主细胞的第一步，它决定病毒能否感染细胞，因此具有特别重要的意义。虽然多数病毒与其细胞受体的关系目前得到了鉴定，但是为什么人类至今仍未发现乙肝病毒的特异性细胞受体？乙肝病毒的特异性细胞受体到底是什么？

乙肝病毒进入人体后，通过血液循环，与肝细胞膜上的特异性受体结合，进入肝细胞，在感染的肝细胞中进行复制、包装和成熟，逸出肝细胞，又再感染其周围的健康肝细胞，如此循环往复，使肝脏出现广泛性损伤。研究表明，肝细胞膜上存在一种乙肝病毒的受体（即与乙肝病毒结合的物质）。一般来说，病毒与人体器官细胞的结合是由靶细胞膜上的特异性受体介导的。细胞膜上有受体，病毒可以与特异性受体结合，即“一把钥匙开一把锁”，这样病毒就进入了肝细胞内。

20 世纪 80 年代，人们发现聚合人血清白蛋白既能特异性地与乙肝病毒颗粒结合，又能与肝细胞结合，很可能充当了乙肝病毒与肝细胞结合的中间媒体。1986 年，Neurath 依据 HBV 前 S1 区分子水平上的研究，提出了肝细胞上可能存在前 S1 受体的新观点。这些发现都证明了肝细胞膜上有乙肝病毒特异性受体存在。因此，干扰病毒与受体之间相互作用可能是早期防止乙肝病毒感染的重要途径。

已有的研究表明，乙肝病毒具有严格的宿主易感性和嗜肝细胞性。乙肝病毒的嗜肝特性，以往只是从乙肝病毒能引起肝脏病变，可导致肝坏死来认识的。后来找到了病毒在肝细胞内复制繁殖的证据。近年来进一步认识到乙肝病毒与肝细胞之间存在着互相对应的镶嵌位点。这个位点在乙肝病毒的外壳，即表面抗原上——其物质基础是聚合人血清白蛋白受体，它是由病毒去氧核糖核酸结构中的前 S2 区编码的 55 个氨基酸残基构成的。而在人的肝细胞膜上也存在着能与聚合人血清白蛋白结合的受体。

有的专家推测，乙肝病毒进入感染者血中后，首先形成乙肝病毒与聚合人血

清白蛋白的复合物。当复合物中的聚合人血清白蛋白找到肝细胞膜上的受体结合后，乙肝病毒就借助结合位点这座桥梁“窜入”肝细胞内。研究发现，聚合人血清白蛋白结合位点具有特异性。只有人和黑猩猩的聚合人血清白蛋白可与乙肝表面抗原结合，表现出对乙肝病毒易感，一些非易感动物如猪、牛、羊、马、猫、鼠等，虽然血中和肝上均有聚合人血清白蛋白成分，但都不能与乙肝表面抗原结合。

另外有专家经研究发现 e 抗原阳性患者的血清中，聚合人血清白蛋白受体的量特别多，而乙肝 e 抗体阳性患者血清中就缺乏聚合人血清白蛋白受体，说明聚合人血清白蛋白受体与乙肝病毒的感染性有关。测定血中聚合人血清白蛋白受体的数量目前已作为乙肝病毒在患者体内复制是否活跃的标志，测定慢性肝炎患者血中的聚合人血清白蛋白受体可判断慢性肝炎是否活动，是否有急性发作。

一般说来，肝细胞受乙肝病毒入侵后，乙肝病毒本身并不直接引起肝细胞的病变，乙肝病毒只是从肝细胞摄取养料得以生存并在肝细胞内进行复制。病毒合成的表面抗原、e 抗原和核心抗原都释放到肝细胞膜上，激发人体的免疫系统来辨认，并发生免疫反应。这种在肝细胞膜上发生的抗原抗体反应可造成肝细胞的损伤和破坏，从而产生一系列临床症状。

乙肝病毒急性感染后，人体对病毒抗原产生相应的抗体，即表面抗体、e 抗体及核心抗体等。一方面这些抗体在血清中企图中和乙肝病毒及其相应的抗原；另一方面人体的细胞免疫发生激活，特别是细胞毒 T 细胞，它会瞄准已经感染乙肝病毒的肝细胞（靶细胞）进行攻击。病毒合成的核心抗原、表面抗原、e 抗原或前 S 抗原等与肝细胞膜脂蛋白结合后受到攻击。结果在清除靶抗原和病毒的同时，这些肝细胞成了牺牲品。肝细胞破坏的多少决定了急性期临床征象的轻重。

慢性肝炎患者中，乙肝病毒的抗原与肝细胞膜结合产生新的抗原，称为肝细胞膜特异性抗原（liver-specific membrane lipoprotein，LSP）。人体免疫系统在产生肝细胞膜特异性抗体的同时会刺激杀伤细胞（K 细胞），K 细胞通过肝细胞膜上的 Fc 受体与肝细胞膜特异性抗原抗体复合物结合，对肝细胞起杀伤作用，同时消灭部分病毒（称为 ADCC）。由于慢性肝炎患者的免疫反应不足，ADCC 的作用时强时弱，以致不能完全清除乙肝病毒。同时由于乙肝病毒已与正常肝细胞成分结合，使人体细胞免疫的识别力减弱。只要乙肝病毒的肝细胞膜特异性抗原伪装不被剥除，慢性肝细胞病变就会周而复始地持续存在。研究发现，慢性乙肝的肝细胞在被破坏的过程中，可产生各种免疫调节因子，它们一方面可使肝脏的免疫反应减轻和局限化，使肝脏不至于进一步损害；但另一方面免疫调节因子的代谢异常，又可使抑制性 T 细胞的活力减低，使细胞毒 T 细胞和 ADCC 作用增加，最终促成自身免疫反应（造成肝内外病变），使疾病迁延不愈。

乙肝病毒主要集中在肝脏，但有研究表明，它并不具有绝对严格的嗜肝性，在肝脏以外的组织中也可能存在，有人在乙肝患者切除的脾脏中就发现了乙肝病毒的踪迹。这使得尚未清晰的研究工作又蒙上了一层神秘的面纱。

导致乙肝治疗手段和药物研发进展不理想的主要原因之一是，HBV 与肝细胞之间相互作用的分子机制的研究相对滞后。病毒表面具有“细胞识别蛋白”，在宿主细胞表面则有相应的靶细胞受体，病毒侵入特定细胞的首要步骤是病毒颗粒与其宿主细胞表面受体特异性相互作用。因此病毒的受体是 HBV 进入肝细胞的门户，阻断 HBV 与其受体的结合是治疗乙型肝炎的重要途径之一。关于 HBV 虽然报道了一些可能起作用的潜在受体，但至今仍无法确定到底是什么受体起关键作用。乙肝病毒真正的细胞内受体目前还是个谜。

参考文献

Bertoletti A, Maini MK. 2000. Protection or damage: a dual role for the virus-specific cytotoxic T lymphocyte response in hepatitis B and C infection? Curr Opin Microbiol, 3: 387～392

Blumberg BS, London WT. 1981. Hepatitis B virus and the prevention of primary hepatocellular carcinoma. N Engl J Med, 304: 782～784

Huang CF, Lin SS, Ho YC, et al. 2006. The immune response induced by hepatitis B virus principal antigens. Cell Mol Immunol, 3: 97～106

Hui CK, Lau GK. 2005. Immune system and hepatitis B virus infection. J Clin Virol, 34 (Suppl. 1): S44～S48

Neurath AR, Kent SB, Strick N, et al. 1986. Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. Cell, 46(3): 429～436

Neurath AR, Strick N, Sproul P, et al. 1990. Detection of receptors for hepatitis B virus on cells of extrahepatic origin. Virology, 176(2): 448～457

Neurath AR, Strick N, Sproul P. 1992. Search for hepatitis B virus cell receptors reveals binding sites for interleukin 6 on the virus envelope protein. J Exp Med, 175(2): 461～469

Neurath AR, Strick N. 1994. The putative cell receptors for hepatitis B virus (HBV), annexin V, and apolipoprotein H, bind to lipid components of HBV. Virology, 204(1): 475～477

撰稿人：吴建国
武汉大学

中心法则面临的挑战：朊病毒和逆转录病毒的复制

Challenges of the Central Dogma：Replication of Prion and Retroviruses

1958 年克里克（Crick）提出的中心法则（central dogma）理论，为分子生物学的建立奠定了基础，也是现代生物学最基本、最重要的规律之一，被公认为遗传信息在细胞内转移的基本法则。中心法则指遗传信息从 DNA 传递给 RNA，再从 RNA 传递给蛋白质，即完成遗传信息转录和翻译的过程；也可以从 DNA 传递给 DNA，即完成遗传信息的复制过程。脱氧核糖核酸（DNA）或核糖核酸（RNA）分子中具有功能意义的核苷酸顺序称为遗传信息。遗传信息的转移包括核酸分子间的转移、核酸和蛋白质分子间的转移。中心法则曾经指出遗传信息的传递是从 DNA 到 RNA 再到蛋白质，它说明遗传信息在不同的大分子之间的转移都是单向的，是不可逆的，只能从 DNA 到 RNA，从 RNA 到蛋白质。

随着研究的深入，中心法则在形式上和内容上都不断得到了修正和充实。1970 年，Temin 和 Baltimore 等发现 RNA 病毒在宿主细胞中的复制是以病毒 RNA 分子为模板合成 DNA 分子，再以 DNA 分子为模板合成新的病毒 RNA，这些病毒被称为逆转录病毒。这一发现是中心法则提出后的最新发现。因此，克里克在 1970 年提出了更完整的中心法则，其中心论点是遗传信息一旦转移到蛋白质之后，既不能从蛋白质转移到蛋白质，也不能从蛋白质逆转到核酸。中心法则合理地说明了在细胞的生命活动中两类生物大分子的关联和分工：核酸是储存和转移遗传信息、指导和控制蛋白质合成的生物大分子；而蛋白质是进行新陈代谢和组成细胞结构的生物大分子。

进一步研究发现，病毒的复制方式因病毒基因组类型不同而异，病毒 RNA 自我复制和以 RNA 为模板逆转录成 DNA 的过程是对中心法则的补充。双链 DNA 病毒的转录方式与宿主细胞相同；单链 DNA 病毒需要通过双链阶段后再转录出 mRNA；单链正链 RNA 病毒的 RNA 可直接作为信使，利用宿主的蛋白质合成机器合成它所编码的蛋白质；单链负链 RNA 病毒则需先转录成互补的正链作为其 mRNA。反转录病毒的复制方式，丰富了遗传信息传递的中心法则。

朊病毒（又称 prion），这是一类与一般病毒不同的生物，它只有蛋白质而无核酸，有与许多传统的病原体不同的特性，但却有感染性和遗传性。具有致病性的 prion 是一种能复制和沉淀，并且具有传染性和极强抵抗力的特殊蛋白质颗粒

(30～50nm)。朊病毒与其他已知病毒一样，具有可滤过性、传染性、致病性及宿主特异性等特点。普鲁西纳（Stanley B Prusiner）于 1982 年提出了朊病毒致病的“蛋白质构象致病假说”。该假说指出，朊病毒蛋白有两种构象：细胞型（正常型 PrP^{C}）和搔痒型（致病型 PrP^{Sc}），两者的主要区别在于其空间构象上的差异。PrP^{C} 仅存在 α 螺旋，而 PrP^{Sc} 有多个 β 折叠存在；Prp^{Sc} 可胁迫 PrP^{C} 转化为 Prp^{Sc}，实现自我复制，并产生病理效应；基因突变可导致细胞型 PrP^{Sc} 中的 α 螺旋结构不稳定，并自发性转化成 β 折叠和变为 Prp^{Sc} 型，最终通过多米诺效应倍增致病。朊病毒致病的假说揭示了两点：朊病毒是蛋白质，不包含 DNA 和 RNA 成分；朊病毒是由正常功能蛋白质的空间结构变异而成。同时也提示：朊病毒的复制不是以核酸为模板，而是以蛋白质为模板，这对探索生命的起源与生命现象的本质产生了重大的影响。因此，朊病毒以蛋白质作为遗传信息的载体，实现了遗传信息从蛋白质传递给蛋白质的目的。有关朊病毒的研究曾分别于 1976 年和 1997 年获得诺贝尔生理学/医学奖。

一个不含 DNA 或 RNA 的蛋白质分子能在受感染的宿主细胞内产生与自身相同的分子，且实现相同的生物学功能，即引起相同的疾病，这意味着这种蛋白质分子也是负载和传递遗传信息的物质，从根本上动摇了遗传学的基础。如果朊病毒的遗传信息存在于蛋白质分子自身，则有两种可能性：蛋白质的空间结构储存着信息，指导合成新的肽链；转译的遗传信息倒流，即在朊病毒蛋白质指导下合成 mRNA，再指导合成朊病毒蛋白质。然而，至今尚未发现逆转译酶。

逆转录病毒和朊病毒的发现对于中心法则而言是补充还是冲击？“DNA→蛋白质”与“蛋白质→蛋白质”之间的矛盾将如何解决？对这一问题的深入研究不仅能够丰富生物学有关领域的内容，对分子生物学、分子病毒学、分子遗传学等学科的发展将产生重要的影响，对探索生命起源与生命现象的本质也有着重要的意义。

中心法则理论的核心思想并非简单的线性传递关系，而是核酸与蛋白质之间复杂的相互作用。随着生命科学研究的飞速发展，人类一定能揭开生命遗传信息更多的奥秘，中心法则的外延和内涵都将极大地得到拓展和充实，中心法则将发展为延续、开放的广义中心法则——一种揭示核酸与蛋白质之间相互作用、相互影响、密切合作，共同完成遗传信息的储存、复制、传递、加工和修饰等的生命过程。

随着生物学的发展和人类的进步，各种病毒等微生物也不断突变着、进化着，这给人类带来新的契机、新的挑战。自然界在不断地推陈出新，人类也不能停下探索的步伐。

参考文献

Baltimore D. 1995. Discovery of the reverse transcriptase. FASEB J, 9(15): 1660～1663

Colby DW, Wain R, Baskakov IV, et al. 2010. Protease-sensitive synthetic prions. PLoS Pathog, 6(1): e1000736

Crick F. 1970. Central dogma of molecular biology. Nature, 227: 561～563

Legname G, Baskakov IV, Nguyen HO, et al. 2004. Synthetic mammalian prions. Science, 305 (5684): 673～676

McKinley MP, Bolton DC, Prusiner SB. 1983. A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. Cell, 35(1): 57～62

Tamgüney G, Miller MW, Wolfe LL, et al. 2010. Asymptomatic deer excrete infectious prions in faeces. Nature, 466(7306): 652

Temin HM, Baltimore D. 1972. RNA-directed DNA synthesis and RNA tumor viruses. Adv Virus Res, 17: 129～186

Werner E. 2005. Genome semantics, in silico multicellular systems and the central dogma. FEBS Lett, 579: 1779～1782

撰稿人：吴建国

武汉大学

单纯疱疹病毒、艾滋病病毒和丙型肝炎病毒疫苗的研制

Challenge of HSV、HIV and HCV Vaccines

单纯疱疹病毒（herpes simplex virus，HSV）是一类严重危害人类健康、引起皮肤病和性病的重要病原体，还可显著促进人类免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus，HIV）的感染。HIV 感染可致严重的获得性免疫缺陷综合征（AIDS），即众所周知的艾滋病。丙型肝炎病毒（hepatitis C virus，HCV）感染引起的丙型肝炎也是一种严重危害人类健康的慢性传染病。通常，疫苗是预防控制病毒性传染病传播致病最有效的措施，因此亟须研制出一些有效的疫苗以避免这三种病毒感染而影响人类的健康。然而，由于这三种病毒具有复杂的生活周期等因素，所以 HSV、HIV 和 HCV 疫苗的研制是目前人类无法攻克的科学难题。

HSV 是早在 20 世纪 30 年代就被鉴定的第一个疱疹病毒，与之相比，HIV 和 HCV 分别于 1981 年和 1989 年才被鉴定分离到病毒，尽管这三种病毒出现得有早有晚，但是自它们被发现广泛流行后，所导致的传染病也引起了人们的高度重视。自从 HSV、HIV 和 HCV 被发现以来，科学家们对它们从分子生物学到分子免疫学等各方面进行了广泛的研究，目的在于深入了解这些病毒的特性，试图研制出像天花疫苗一样有效的病毒疫苗以控制它们的传播、流行及致病，并消灭它们。作为一种理想的病毒疫苗，除了安全性外，最重要的是可以有效诱发广泛的体液和细胞免疫应答并抵抗病毒的再感染。为了研制出有效的疫苗以控制这三种病毒性传染病，研究者曾进行过很多尝试，包括：①亚单位疫苗，该疫苗研究的重点主要集中在病毒侵入细胞所必需的表面糖蛋白上，它们主要激活 $CD4^+$ T 细胞来诱导体液免疫和细胞免疫。②减毒活疫苗，该疫苗主要是缺失或突变其重要毒性基因，使其毒性减弱。③复制缺陷病毒疫苗，该疫苗对病毒基因组复制、合成及病毒颗粒装配必需的一个或多个基因进行突变或缺失，导致病毒复制受阻而不产生子代病毒，但却能正常表达基因产物，诱导免疫应答。④DNA 疫苗，主要是将病毒的编码基因克隆入质粒 DNA 中，直接接种于体内诱导免疫应答。⑤载体疫苗，主要是以其他病毒或细菌作为载体表达一个或多个具有免疫原性的病毒蛋白，诱导广泛的免疫应答。尽管这些疫苗在针对不同动物的实验中取得了一系列令人鼓舞的成果，如能够诱发高滴度的特异性中和抗体、有效地保护

动物免于强毒攻击等，却无法有效阻止病毒在人体内的复制感染及再复发。直到现在，人们还是没有找到一种能够应用于人类的有效疫苗。

长期以来，这些疫苗研制之所以是世界难题，是由多方面的原因造成的。首先，基因组大而复杂。HSV 的基因组为 150kb 的双链 DNA，编码约 80 种病毒蛋白，而且许多病毒蛋白具有多功能性，缺失一个病毒蛋白导致的表型可以由其他蛋白质补偿，这就使在基因水平上操作病毒研究 HSV 的分子生物学特性变得困难。其次，病毒生活周期的复杂性，可在宿主内建立潜伏感染。HSV 感染细胞后在细胞核内利用宿主和病毒的复制元件复制转录，通过高度有序级联相关的方式翻译立即早期、早期、晚期蛋白，进而组装病毒颗粒，病毒感染上皮细胞形成裂解感染。同时 HSV 也可以感染三叉神经节及骶背根神经节的感觉神经元建立终生潜伏感染，当人受到压力或局部刺激（如生理或精神压力、体温过高、暴露于紫外线、月经或激素失调）后，潜伏的 HSV 会被激活而复发并感染神经元支配的上皮细胞，形成裂解感染。同样，HIV 感染后其前病毒 DNA 能够整合到宿主细胞基因组中，此时很少表达或不表达病毒蛋白，几乎不产生病毒颗粒，从而形成潜伏感染。HSV、HIV 这种在人类宿主建立终生潜伏感染的能力是对人类智力的最大挑战，也是研制这些抗病毒疫苗的最大难题。最后是病毒复杂而独特的免疫逃逸机制。HSV 堪称免疫逃逸专家，其编码的众多病毒蛋白通过多种方式干扰或拮抗宿主的免疫应答，从而有利于病毒感染入侵细胞（如 UL41 蛋白可以关闭宿主蛋白合成，US11 可以干扰宿主先天免疫和抗凋亡功能）。HIV 可直接干扰免疫系统，利用 T 细胞的 CD4 分子作为受体，感染并杀死 $CD4^{+}$ T 细胞，也能使辅助 T 细胞丧失其功能，进而逐渐破坏宿主免疫系统，导致 AIDS 的发生。另外，HIV 和 HCV 基因的高变异性也使其容易逃避免疫系统的监控。总之，对病毒潜伏感染、再激活致病及其逃避宿主免疫应答机制的认识不够严重制约了这些疫苗的研制。

HIV 疫苗的研制作为人类的科学难题之一，其原因也包括：①HIV 自然感染在人体不能诱导有效保护力，即在进化上人类不足以抵御 HIV。黏膜免疫是阻止 HIV 通过黏膜上皮传播的外部屏障，所以预防 HIV 感染的疫苗必须能诱导长期有效的黏膜免疫应答。然而 HIV 对全身免疫系统的破坏使其很难诱导产生有效的黏膜免疫，这也是研制疫苗的最大障碍。②HIV 直接攻击疫苗赖以发挥作用的免疫系统。③HIV 缺乏理想的动物模型。此外，HIV 的高度变异也大大增加了获得广谱保护性疫苗的难度。HIV 的这些特性对过去行之有效的疫苗传统理论和技术路线提出了严峻的挑战。与 HIV 一样，HCV 也是 RNA 病毒，病毒的高度变异也是 HCV 疫苗研制进展缓慢、难以成功的难题之一。其他原因还包括：①HCV 复制力差，体内滴度低，不易传代培养，免疫原不易大量制备。②HCV感染力弱，目前没有理想的细胞和动物模型，除黑猩猩外，其他动物，

即使灵长类动物，如狒狒、恒河猴等都不能被 HCV 感染。③HCV 编码的多种蛋白质，如核心蛋白和非结构蛋白均和 HCV 的致癌性有关，是 HCV 疫苗安全性必须考虑的重要因素。

尽管研发 HSV、HIV、HCV 等重要病毒疫苗是人类面临的科学难题，但国际上无数例证显示，社会环境因素对于研发疫苗影响巨大。除了良好的政策环境支持，疫苗临床观察现场管理的规范化、社会伦理道德观遵循程度、社区预防与治疗服务质量、社会公众参与意识等，都直接影响疫苗研发的进程。虽然目前尚无应用于临床的有效且安全的 HSV、HIV、HCV 疫苗，但随着局部黏膜免疫机制、病毒潜伏感染机制及病毒免疫逃逸机制等难点研究的不断深入，在国内外学者的不断努力下，HSV、HIV、HCV 疫苗的研制将不断向前推进。

参考文献

Chida Y, Mao X. 2009. Does psychosocial stress predict symptomatic herpes simplex virus recurrence? A meta-analytic investigation on prospective studies. Brain Behav Immun, 23: 917～925

Ferenczy MW. 2007. Prophylactic vaccine strategies and the potential of therapeutic vaccines against herpes simplex virus. Curr Pharm Des, 13: 1975～1988

Freeman EE, White RG, Bakker R, et al. 2009. Population-level effect of potential HSV2 prophylactic vaccines on HIV incidence in sub-Saharan Africa. Vaccine, 27: 940～946

Koike K, Moriya K, Kimura S. 2002. Role of hepatitis C virus in the development of hepatocellular carcinoma: transgenic approach to viral hepatocarcinogenesis. J Gastroenterol Hepatol, 17: 394～400

Paladino P, Mossman KL. 2009. Mechanisms employed by herpes simplex virus 1 to inhibit the interferon response. J Interferon Cytokine Res, 29: 599～607

Richman DD, Margolis DM, Delaney M, et al. 2009. The challenge of finding a cure for HIV infection. Science, 323: 1304～1307

Roizman B, Knipe DM, Whitley RJ. 2007. Herpes Simplex Virus, Fields Virology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2501～2601

Sheridan BS, Knickelbein JE, Hendricks RL. 2007. CD8 T cells and latent herpes simplex virus type 1: keeping the peace in sensory ganglia. Expert Opin Biol Ther, 7: 1323～1331

Stoll-Keller F, Barth H, Fafi-Kremer S, et al. 2009. Development of hepatitis C virus vaccines: challenges and progress. Expert Rev Vaccines, 8: 333～345

Wilson SS, Fakioglu E, Herold BC. 2009. Novel approaches in fighting herpes simplex virus infections. Expert Rev Anti Infect Ther, 7: 559～568

撰稿人：郑春福
中国科学院武汉病毒研究所

病毒致宿主细胞死亡的模式及其细胞分子机制

The Modes and Molecular Mechanisms on the
Dying Host Cells with Virus

1. 背景

细胞死亡（cellular death）是细胞受到严重损伤时以代谢停止、功能丧失、结构破坏为特征的不可逆反应过程。此过程分为程序性死亡（programmed cell death，PCD）和非程序性死亡（non-programmed cell death）。前者是细胞主动自杀过程，为生物体在长期进化过程中所形成的一套精密的根据内环境变化而发生的调节机制。后者则被称为坏死，由急性严重破坏细胞生存的外界因子引起。已有科学家提出：坏死并非都是非程序性的，可能包含有死亡过程未知的细胞死亡模式。

灾难性细胞死亡是众多疾病导致机体死亡和终生残疾的根本原因；PCD 广泛涉及胚胎发育、细胞更新、创伤修复、组织和器官结构与功能稳定及协调合作、生命的各种功能、对外界刺激的反应、自身免疫性疾病及癌症的征服等。如此重大的科学问题，在十几年前，人们却忽视了研究。究其原因，一是人们错误地认为它是消极的和无价值的东西；二是引起细胞死亡的模式复杂；三是不同死亡模式的细胞分子机制更复杂。可见，细胞死亡模式及其细胞分子机制应该是一个至关重要的科学难题。

2. 科学意义

病毒是细胞的专性寄生物，一定的病毒感染一定的细胞。也就是说，不同的细胞遗传背景决定着其特定的病毒病原，决定着病毒与细胞相互作用的后果，决定着病毒致细胞死亡的模式。几乎所有种类的细胞都可以被病毒感染，甚至导致细胞死亡，包括成体细胞、生殖细胞、干细胞和肿瘤细胞。因此，以特异性病毒做探针去研究不同细胞的死亡模式及其细胞分子机制得天独厚，将会系统地阐释细胞死亡现象的模式和本质，有助于发育生物学的研究、组织和器官结构的稳定、各种生命功能的实现、组织细胞的更新和创伤的修复、对外界刺激和压力的反应、重大急性病（如脑卒中、心肌梗死和脑外伤）和慢性病（如神经性退行性变）的防治、临床病毒病和自身免疫性疾病的防治及癌症的征服等一系列重大前沿科学问题的解决。

3. 最新进展

细胞死亡分为程序性（调节性）死亡和非程序性（非调节性）死亡。凋亡（apoptosis）归于经典的程序性细胞死亡；坏死（necrosis）归于所谓的非程序性细胞死亡。

目前对细胞死亡的分类尚未获得共识。早在 1990 年，Clarke 等按照形态学特征对细胞死亡进行了分类，此即 Clarke 分类。他将 PCD 分为Ⅰ类（凋亡）、Ⅱ类（自吞噬性程序性细胞死亡）和Ⅲ类（坏死样程序性细胞死亡）。显然，这种分类受到当时人类对细胞死亡认识的局限。目前，人类不仅对坏死的认识不清，而且对 PCD 的认识仍然非常肤浅，分类含混，并采用形态与机制双重标准对 PCD 分类：凋亡和非凋亡性程序性细胞死亡（non-apoptotic PCD）；后者又分为副凋亡（paraptosis）、肿胀坏死（oncosis）、自吞噬性程序性细胞死亡（autophagy）、细胞有丝分裂灾难（mitotic catastrophe）等。此外，还有其他分类方法。

细胞死亡模式非常复杂，仅就凋亡来说，就涉及几条信号转导途径，如死亡受体（death receptor，DR）介导的凋亡、线粒体（mitochondrion）介导的凋亡、内质网应激（ER stress）介导的凋亡等。PCD 是细胞自杀机制，凋亡是细胞自杀的首选机制。当细胞不能利用凋亡时，自噬就承担起自杀作用。很显然，仅此就会涉及很多复杂的问题。

有关凋亡细胞的显微和超微结构特征；凋亡过程各时段及其特征；细胞死亡相关细胞器（如线粒体、细胞膜、内质网、溶酶体）；参与细胞死亡的生物分子（如死亡受体、p53、caspases、Bcl-2、TNF、Cyto C、RIP1、AIF 及核酸内切酶等）及其功能和表达调控；参与细胞死亡信号转导的生物大分子（一系列的激酶）及其功能和表达调控；不同死亡信号转导网络及相关网络间的对话；以及相关无机物（NO、活性氧类、胞浆 Ca^{2+}）等数据和信息或多或少地有了一些科学积累。人类对细胞死亡已经获得了一定量的科学数据，构建出了大体框架。但是，对于认清细胞死亡的模式及其细胞分子机制来说，尚需我们努力探索。

4. 主要难点及可能解决难题的突破点

如前所述，细胞死亡过程是程序性的，所以其死亡机制必然复杂。况且，自然界有无限的致细胞死亡因子和无法计数的不同遗传背景的细胞。不同的损伤因子就是对同一遗传背景的细胞也会诱导出不同的死亡模式和机制，并且依损伤因子的强度不同，细胞还会表现出不同的死亡过程和速度。同样地，同一损伤因子作用于遗传背景各不相同的细胞也会产生复杂的细胞死亡模式和机制。无限的损伤因子作用于无限遗传背景的细胞必然会产生更为复杂的细胞死亡模式和机制。因此，“复杂”就是人类认识细胞死亡模式和细胞分子机制的主要难点。

病毒是携带着生物信息的分子生物，其感染细胞的事件就是转基因事件。病

毒基因及其编码蛋白进入细胞必然会占用细胞的装置、能量和资源，干扰细胞的正常代谢，引起细胞一系列反应，包括代谢程序改变、结构破坏、细胞死亡、临床疾病发生或肿瘤细胞死亡。几乎所有种类的细胞都有特定的敏感病毒（细胞损伤因子）。并且，病毒对敏感细胞的作用后果可以通过控制其滴度（即强度）来实现。因此，以不同的病毒作探针研究不同细胞的死亡模式及其细胞分子机制是一个十分理想的模型系统，应该是解决本科学难题的有效突破点。同时也必然会伴随解决病毒致病的机制、病毒病的防治及靶向溶癌病毒的应用问题。

参考文献

Abraham MC, Lu Y Shaham S. 2007. A morphologically conserved nonapoptotic program promotes linker cell death in *Caenorhabditis elegans*. Dev Cell, 12: 73～86

Broker LE, Kruyt FA, Giaccone G. 2005. Cell death independent of caspases: a review. Clin Cancer Res, 11: 3155～3162

Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. 2006. Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. Biochim Biophys Acta, 1757, 639～647

Horvath EM, Szabo C. 2007. Poly(ADP-ribose) polymerase as a drug target for cardiovascular disease and cancer: an update. Drug News Perspect, 20, 171～181

Hu J, Dong CY, Joseph Li, et al. 2008. In vitro selective cytotoxic effect of human cancer cells by Bluetongue virus-10. Acta Oncologica, 47, 124～134

Leist M, Single B, Castoldi AF, et al. 1997. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. J Exp Med, 185, 1481～1486

Maiuri M C, Zalckvar E, Kimchi A, et al. 2007. Self-eating and self-killing: cross-talk between autophagy and apoptosis. Nature Rev Mol Cell Biol, 8, 741～752

Rao R, Ellerby H, Bredesen D. 2004. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Cell Death Differ, 11: 372～380

Roberts MS, Lorence RM, Groene WS, et al. 2006. Naturally oncolytic viruses. Curr Opin Mol Ther, 8(4), 314～321

Youle RJ, Strasser A. 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nature Rev Mol Cell Biol, 9: 47～59

撰稿人：董长垣

武汉大学

闯入人类基因组中的病毒

“Viruses” in Human Genome

1. 背景

2001 年 2 月 12 日，美国 Celera 公司与人类基因组计划分别在《Science》和《Nature》杂志上公布了人类基因组精细图谱及其初步分析结果，为人类生命科学开辟了一个新纪元。然而测序的结果却带来一些意想不到的结论。首先是编码表达蛋白质的基因数目为 20 000～25 000，大大低于以前的估计。这些编码的基因只占基因组的 1.5%，剩余的部分是大量的重复片段，或者是没有功能的“垃圾 DNA”。随着基因序列的分析完毕，一个更大的疑问摆在面前，序列分析显示人类基因组中多达 34% 是由反转录转座子（retrotransposon）构成的，其中就包括了大约占基因组比例 8% 的人类内源性逆转录病毒（human endogenous retroviruses，HERV）。

早在 20 世纪 70 年代初期，科学家在研究风疹病毒对哺乳动物胎儿的影响时，在电子显微镜下就意外地观察到内源性逆转录病毒从胎盘中的合包体滋养层慢慢出芽。进一步的研究表明，几乎所有的哺乳动物包括人类都含有这种病毒。

2. 科学意义

HERV 数量虽多，但大部分由于突变、缺失等的积累，埋植在人类基因组中的 HERV 无法从宿主的 DNA 上转录、复制并感染另一个细胞，因此大多数研究人员将内源性病毒视为“垃圾 DNA”。但越来越多的研究表明一些 HERV 已经和人类基因结合起来，扮演起新的角色。第一个被找到的对象是一种逆转录病毒的残迹，这种名为 HERV-W 的基因产物在人类基因组上大约有 650 处整合，其中有一处在 7 号染色体上。该处整合包含了一个名为 syncytin-1 的基因，此基因所编码的一种蛋白质原本用于病毒外膜组装，现在这种蛋白质在维持人类胎盘正常功能方面起着关键作用。另外一个名为 syncytin-2 的基因产生一种参与构建胎盘的关键蛋白质，该基因也是源自一种病毒；至少有六种其他的病毒基因有助于正常胎盘功能的行使，有证据表明，这些内源性逆转录病毒对临床医学研究具有重要意义。另一方面，HERV 是几百万年前整合到人类基因组中，并以孟德尔方式遗传至今的逆转录病毒的残余物，而越来越多的证据证明病毒极大地改变了人类的进化历程。

3. 最新进展

那么病毒DNA是如何“跑到”人类基因组上的？它在人类的进化中扮演什么角色？它对人类的生理功能会施加什么样的影响？目前提出的一个假说是一些致病性的病毒通过共生与它们的宿主发生一种微妙的作用关系，也就是共生起源，而且同时会对宿主的进化有着重要的意义。

众所周知，艾滋病毒（HIV）属于逆转录病毒，它会攻击人体免疫系统的细胞（主要是淋巴细胞），然后将自身插入细胞的基因组中，这个过程即所谓的内源化过程。一旦成功地插入细胞基因组，HIV就开始不停地复制和扩散，直到宿主死亡，HIV才会死亡。与HIV不同的是，内源性逆转录病毒能够永久地将其遗传物质插入宿主的DNA中。随着哺乳动物的进化，内源性逆转录病毒感染了宿主的生殖细胞，从而成为宿主遗传基因组的一部分，遗传给宿主的子代。内源性逆转录病毒几乎在所有哺乳动物包括人类的基因组中存在。因此某种程度上可以说内源性逆转录病毒是远古逆转录病毒感染在哺乳动物体内的残留。

像这样的生殖细胞内源化过程在我们人类的发展史上经历过多次，这可能是人类基因组中所有病毒DNA的来历。人类基因组包含数以千计的人类内源性逆转录病毒，它们来自30～50个不同的族系，这些病毒残余应该是人类进化史上病毒性传染病的遗留产物。

值得一提的是，逆转录病毒在内源化过程中并没有垄断性的地位。最近研究人员报道在几种哺乳动物包括人类的基因组中发现了来自博尔纳病毒（Bornavirus）的基因，这是第一次在哺乳动物基因组中鉴别出非逆转录病毒属的病毒DNA。博尔纳病毒是未分段的、负链RNA病毒，在被感染细胞的细胞核中复制。

4. 主要难点

关于起源：病毒DNA如何进入人类基因组中仍是一个未知的命题，现有的一些解释仍处于假说阶段，需要大量确实可靠的实验证据来证明其来源。

关于疾病：内源性逆转录病毒已证实与许多疾病密切相关，例如HERV-K的转录在畸胎瘤细胞株、乳腺癌组织及细胞株、黑色素瘤组织及细胞、生殖细胞瘤、恶性妊娠滋养细胞疾病组织中都有报道。在典型的精原细胞瘤患者血清中也检测到HERV-K家族基因编码的蛋白抗体，HERV-K的Gag蛋白在相应的肿瘤活检组织中也检测到了。目前研究人员还不清楚HERV与疾病之间的关系。例如癌症，是HERV再度觉醒引发了癌症，还是癌症促使HERV再度觉醒，或者两者都不是？目前有很多问题尚待解决。

5. 展望

在灵长目动物中，这些病毒DNA在距今超过4000万年前遗留在哺乳类祖先的基因组中，可以预计将来会有越来越多的类似发现。这也许可以用来解释人

类基因组中那神秘的另一半，为研究脊椎动物的进化史提供宝贵资料，同时为各种疾病的治疗提供更多的信息和依据。

参 考 文 献

Belshaw R, Katzourakis A, Paces J, et al. 2005. High copy number in human endogenous retrovirus families is associated with copying mechanisms in addition to reinfection. Mol Biol Evol, 22:814～817

Herbst H, Sauter M, Mueller-Lantzsch N. 1996. Expression of human endogenous retrovirus K elements in germ cell and trophoblastic tumors. Am J Pathol, 149:1727～1735

Horie M, Honda T, Suzuki Y, et al. 2010. Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. Nature, 463:84～87

Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature, 409:860～921

Stauffer Y, Theiler G, Sperisen P, et al. 2004. Digital expression profiles of human endogenous retroviral families in normal and cancerous tissues. Cancer Immun, 4:2

Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. 2001. The sequence of the human genome. Science, 291:1304～1351

撰稿人：陈新文

中国科学院武汉病毒研究所

地球上有多少病毒种类

How Many Virus Species on the Earth

1. 背景

病毒是专一性寄生于各种生命体活细胞的生物大分子复合体，离开活细胞的病毒无法完成生活周期。病毒结构非常简单，由衣壳蛋白（有的病毒还有囊膜蛋白包围）包裹遗传物质（DNA 或 RNA）。每个物种都携带有病毒，从低等的原核生物（细菌和蓝藻）、古细菌到高等植物、动物和人类。病毒在不同物种间遗传物质的转移、遗传多样性和遗传进化过程中起着关键的作用。感染细菌的病毒（噬菌体）是水体中最丰富的病毒群体，每毫升水体里病毒颗粒达 10^8。这些噬菌体在控制宿主种群数量，维持碳循环和初级食物链等水生态环境中起着主要的作用。病毒有可能是最早的生命大分子形式，其起源、数量和种类都不清楚。2008 年，第九次国际病毒学命名委员会命名的病毒种类有 2288 种，分属于 348 个病毒属、87 个病毒科（图 1）。这些已经确认的病毒种类一般来说符合国际病毒学命名委员会对病毒分类标准的大部分条件（病毒种是组成一个复制系并占有一个特定生态环境的一类多原则病毒）。另外还有 3000 多种病毒分离株没有被正式列为病毒种。而每个病毒种还有不同的基因型和分离株。目前已经知道，感染人类的病毒超过 200 种。我们熟知的流感病毒、艾滋病病毒、肝炎病毒和 SARS 病毒等都曾经或正在对人类的生命造成威胁。

2. 科学意义

关于病毒起源的问题，目前有三种学说：第一种学说认为，病毒是地球上生物进化过程中的一种最为原始的生命物质；第二种学说认为，病毒是一种高级微生物的退行性生命物质，微生物细胞在生命历程中的部分基因丢弃使其丧失独立的自我繁殖能力，最终退化为病毒；第三种学说认为，病毒来源于正常细胞的核酸，因偶然途径从细胞内脱离出来而变为病毒。这三个学说只能部分解释某些病毒的起源，不能完全解释病毒的起源问题，根本原因还在于我们对病毒的了解不够深入。病毒不仅以游离的形式感染细胞，还能插入宿主的基因组，例如有 8% 的人类基因组是逆转录病毒的序列，最近科学家在人类基因组中又发现了非逆转录病毒的序列。对病毒种类认识的增加，有可能使我们知道人类基因组内更多的病毒序列，从而研究这些序列的来源及其对人类健康的影响。据报道，在人类常见的呼吸道疾病、脑炎和肝炎等中，针对性的检测方法常常不能检测出特异病

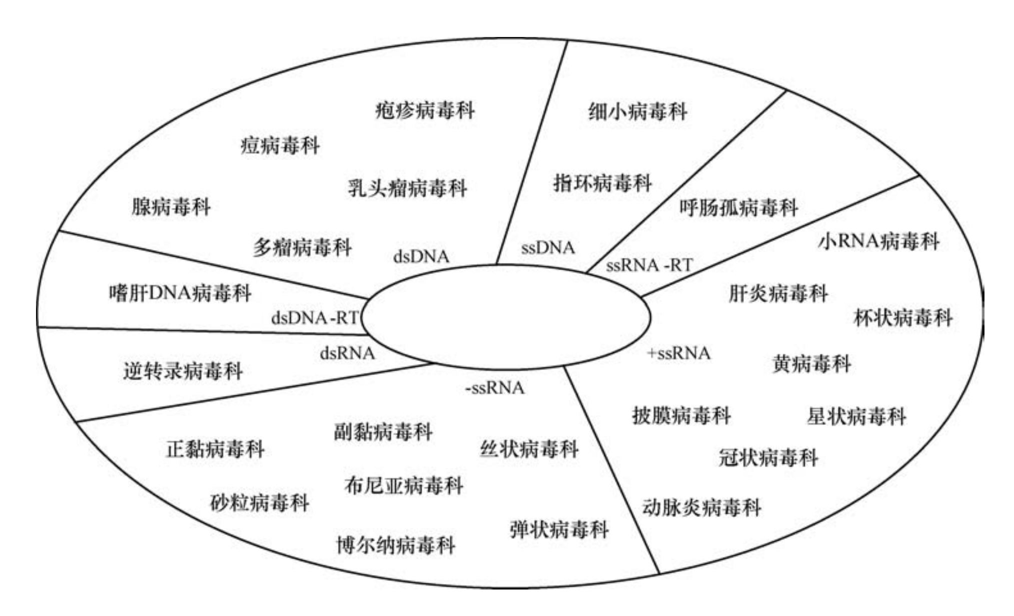


图 1　按照巴尔的摩（Baltimore）病毒分类方法列出的感染人类的病毒科

dsDNA. 病毒基因组为双链 DNA；ssDNA. 病毒基因组为单链 DNA；dsRNA. 病毒基因组为双链 RNA；ssRNA-RT. 病毒基因组为单链 RNA，复制过程有逆转录过程；＋ssRNA. 病毒基因组为单链正义 RNA，基因组可以直接作为模板翻译成蛋白质；-ssRNA. 病毒基因组为单链反义 RNA，病毒基因组不能直接作为模板翻译蛋白质；dsDNA-RT. 病毒基因组为双链 DNA，复制过程有 RNA 和逆转录过程

原，说明有其他未知病原未被我们认识。因此，病毒病原学是研究病毒起源、病原诊断和病毒性疾病预防和控制的基础，是需要长期开展的课题。

3. 最新进展

由于病毒独特的寄生生命形式，病毒的分离培养需要依赖于传统的体内和体外细胞培养技术，因此我们目前知道的病毒种类只是地球上存在的病毒种类的极少部分（不到 1%）。尽管目前有很多病毒鉴定方法，如电镜观察、免疫检测、核酸检测等，但这些方法都是在已知病毒的基础上开展的，不能检测未知病毒。现代分子生物学技术、高通量测序技术和生物信息学分析技术为人类从遗传物质的角度更多、更快地了解和认识病毒的种类提供了强有力的工具。人们利用这些技术对动物和人类的肠道、呼吸道和水环境中存在的病毒群进行了分析，结果表明动物体内和水环境中存在大量种类各异的病毒，发现了许多未知病毒病原，甚至于南极这样极端的环境中同样存在种类丰富的病毒。因此，现代分子生物学技术的发展为我们认识更多的病毒种类提供了可能。

4. 主要难点

病毒病原学的研究仍然要依赖于传统的体内和体外培养。病毒分离和培养遇

到的第一个问题是敏感细胞系和感染的动物模型。因此，建立不同物种、不同组织的原代或传代细胞是一个长期开展的基础条件性工作。而动物感染模型是病毒致病性研究的不可缺少的工具，是近年来亟需加强的工作。

未知病毒的发现越来越多地依赖于现代分子生物学技术。目前发展的随机核酸扩增技术、高通量测序技术和生物信息学分析技术，可以让我们分析不同生境中病毒群的遗传多样性，发现未知病毒，继而对新发现的病毒开展流行病学、宿主范围、对生物的致病性等研究工作。随着病毒基因序列的快速增加，需要强有力的生物信息学分析技术分析归纳这些数据，从遗传进化的角度分析病毒的起源问题。

病毒与宿主进化的时间很长，而我们了解的病毒是经过了许多生命周期后通过遗传变异、进化和适应后的毒株，因此我们获得的病毒及其遗传信息只能代表取材时的信息。如果有技术和方法能获得生命体化石内的病毒序列信息，将会极大地帮助我们认识病毒的起源和进化历程。

5. 展望

据统计，感染人类的病毒有 200 多种，这些病毒很大部分来源于动物。因此要了解感染人类的病毒，更需要了解动物病毒尤其是野生动物携带的病毒，因为这些野生动物携带的病毒一旦跨越种属屏障感染人类就会造成大规模暴发性流行病。我们熟知的艾滋病病毒、汉坦病毒、SARS 病毒和高致病性禽流感病毒等都来源于野生动物；还有虫媒传播的病毒如新疆出血热、登革热乙型脑炎和森林脑炎等一直困扰着人类。随着人口增加、城市化进程的加快和现代农业集约化养殖方式等社会因素的干扰，新发疾病必然会越来越多地侵袭人类社会。因此，认识病毒、研究病毒、预防和控制人类病毒性传染病是病毒学工作者刻不容缓的责任。

参考文献

Breitbart M，Hewson I，Felts B，et al. 2003. Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. J Bacteriol，185：6220～6223

Cann AJ，Fandrich SE，Heaphy S. 2005. Analysis of the virus population present in equine faeces indicates the presence of hundreds of uncharacterized virus genomes. Virus Genes，30：151～156

Edwards RA，Rohwer F. 2005. Viral metagenomics. Nat Rev Microbiol，3：504～510

Horie M，Honda T，Suzuki Y，et al. 2010. Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. Nature，463，84～87

Petrosino JF，Highlander S，Luna RA，et al. 2009. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. Clin Chem，5：856～866

Schoenfeld T，Patterson M，Richardson PM，et al. 2008. Assembly of viral metagenomes from yellowstone hot springs. Appl Environ Microbiol，74：4164～4174

Victoria JG, Kapoor A, Dupuis K, et al. 2008. Rapid identification of known and new RNA viruses from animal tissues. PLoS Pathog, 4: e1000163

Victoria JG, Kapoor A, Li L, et al. 2009. Metagenomic analyses of viruses in the stool of children with acute flaccid paralysis. J Virol, 9: 4642~4651

撰稿人：石正丽
中国科学院武汉病毒研究所

EB 病毒感染和转化鼻咽上皮细胞的机制

Mechanism of EBV Infection and Transformation in Nasopharyngeal Epithelial Cells

1. 背景

Epstein-Barr 病毒（EBV）是双链 DNA 病毒，属于 γ-疱疹病毒亚科淋巴潜隐病毒属。人类是 EBV 唯一的天然宿主，其在人类中的感染率高达 90% 以上。EBV 主要感染 B 细胞和上皮细胞，与许多人类疾病（如传染性单核细胞增多症、致死性 IM /X 性连锁淋巴细胞增生综合征、伯基特淋巴瘤、霍奇金病和鼻咽癌等）密切相关。

鼻咽癌是一种常见的恶性肿瘤，不同地区发病率有明显差异，中国为鼻咽癌高发区，特别是在我国华南地区发病率最高，达 20/10 万。鼻咽癌的病因涉及遗传易感性、EBV 感染、环境等多个因素。在大部分鼻咽癌患者癌组织中发现 EBV 感染，并在鼻咽癌患者血清中检测到 EBV 相关抗体（包括壳抗原、膜抗原、早期抗原及核抗原等），且抗体滴度和肿瘤负荷呈正相关。目前研究认为，EBV 在鼻咽上皮的癌变过程中可能起着重要的作用。

2. 科学意义

EBV 在鼻咽癌发病过程中的机制尚不清楚，其主要原因是 EBV 感染上皮细胞的分子机制还不清楚，如何转化鼻咽上皮细胞的机制也有待阐明。大多数研究认为游离的 EBV 不能直接感染上皮细胞，而是通过反式感染上皮细胞。目前以携带 EBV 的淋巴细胞与上皮细胞直接接触的模型来研究 EBV 感染上皮细胞的机制报道较多，而关于 EBV 感染鼻咽上皮细胞的机制尚未见报道。通过研究 EBV 如何感染鼻咽上皮细胞并阐明其引起鼻咽上皮细胞恶性转化的机制，为预防及治疗鼻咽癌提供新的理论依据，并为阐明 EBV 致癌机制提供科学依据。

3. 最新进展

限制 EBV 感染鼻咽上皮细胞机制研究的主要因素是尚未建立 EBV 高效感染体外培养的鼻咽上皮细胞模型。EBV 感染是鼻咽癌发生过程中的一个早期事件，其感染早于恶性细胞的扩增，但在正常鼻咽上皮细胞并未检测到 EBV 的感染，表明 EBV 感染鼻咽上皮细胞具有时效性。因此，如何捕获 EBV 感染鼻咽上皮细胞这一时机是研究 EBV 如何感染鼻咽上皮细胞的突破点。目前有研究采用鼻咽癌中高表达的原癌基因 Bmi-1 诱导鼻咽上皮细胞的永生化，建立携带癌前病变分

子特征的细胞株，从而来捕获EBV感染上皮细胞的时机。通过特殊的培养方式，利用这些细胞株建立稳定高效的游离EBV感染模型，使游离的EBV直接感染效率可达27.4%（图1）。EBV吸附和进入B淋巴细胞至少由两类分子介导，病毒糖蛋白gp350/gp220与CD21（B细胞EBV受体）结合，使病毒吸附于细胞表面。在膜融合过程中，gp42首先与B淋巴细胞HLA-Ⅱ类分子结合，而膜融合是gp85-gp25-gp110复合物所引起的。大多数文献报道在EBV感染上皮细胞过程中，gp42阻止膜融合，病毒糖蛋白gp85-gp25复合物可能起作用，然而相应的上皮细胞表面受体尚未鉴定成功。

EBV主要以潜伏感染方式感染宿主细胞，体内和体外EBV潜伏感染的特征是缺失病毒颗粒的合成，病毒基因以单克隆附加体形式存在于感染的细胞中。EBV以潜伏感染状态存在于鼻咽癌细胞中，只表达少数基因。EBV潜伏蛋白包括6种核抗原（EBNA 1、2、3 A、3B和3C和EBNA-LP）和3种潜伏膜蛋白（LMP1、LMP2A和LMP2B），这些病毒蛋白通过调控各种信号通路来帮助细胞的永生化和恶性转化。EBNA-1是在所有与EBV相关的恶性肿瘤中唯一表达的病毒蛋白。LMP1能使啮齿动物纤维原细胞致瘤，并且是EBV诱导人B淋巴细胞生长转化所必需的效应蛋白。LMP2A转染人角质化细胞株HaCaT后，能使细胞增殖及转化并可在裸鼠中形成肿瘤。有报道发现LMP2A能增强鼻咽癌细胞的体外克隆形成能力及体内成瘤能力，并且诱导鼻咽癌细胞EMT和肿瘤干细胞样细胞群体。

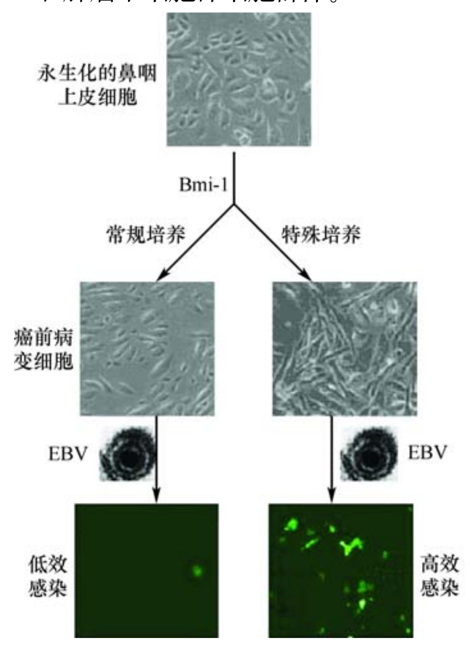


图1　EBV高效感染体外培养的鼻咽上皮细胞模型

4. 主要难点

研究 EBV 和宿主之间的相互作用机制，包括病毒如何感染宿主细胞，通过何种方式、以何种病毒糖蛋白吸附及进入，EBV 的几种重要潜伏蛋白如何转化宿主细胞，宿主细胞是通过何种表面受体与病毒结合、促进病毒感染等关键问题，从而阐述致瘤病毒感染和转化上皮细胞机制，以及揭示致瘤病毒在细胞内信号通路的调控网络及致瘤病毒激活和细胞裂解机制。采用永生化鼻咽上皮细胞模型研究 EBV 重要的潜伏膜蛋白是否能使永生化的鼻咽上皮细胞恶性转化，能否进一步阐明 EBV 潜伏膜蛋白在鼻咽癌发生、发展中的作用和机制。明确介导 EBV 感染上皮细胞的病毒糖蛋白；筛选并鉴定介导 EBV 感染鼻咽上皮细胞的受体，阐明 EBV 感染上皮细胞的机制；系统研究 EBV 感染鼻咽上皮细胞的受体所处的上下游信号通路及 EBV 感染鼻咽上皮细胞后的早期分子事件，以及 EBV 重要潜伏基因诱导永生化的鼻咽上皮细胞恶性转化的作用和信号通路，以期阐明 EBV 感染和转化鼻咽上皮细胞的机制。

5. 展望

本问题以鼻咽癌的发病机制作为主要研究目标，瞄准“潜伏感染与肿瘤”这个肿瘤研究领域的突破口，紧密围绕“EBV 感染和转化鼻咽上皮细胞的机制”这一科学问题，旨在阐明致瘤病毒感染上皮细胞及诱导其转化的分子机制。

在特有的 EBV 高效感染的细胞模型基础上，筛选和鉴定介导 EBV 黏附和结合的病毒表面糖蛋白；之后采用免疫共沉淀和蛋白质谱分析，并结合生物芯片技术筛选一批特殊培养条件下的可高效感染 EBV 与普通培养下 EBV（感染效率低）差异表达的膜蛋白；结合文献报道其他病毒（HIV、SARS 和 H1N5 等）相应的细胞表面受体的信息，鉴定上皮细胞 EBV 受体；进而阐明 EBV 感染上皮细胞的机制及引起细胞转化的病理分子过程，为明确 EBV 与鼻咽癌的关系提供新证据，也可为预防鼻咽癌的特异性 EBV 疫苗的开发及抗 EBV 药物的设计打下基础。

参 考 文 献

Borza CM，Hutt-Fletcher LM. 2002. Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. Nat Med，8(6)：594～599

Chesnokova LS，Nishimura SL，Hutt-Fletcher LM. 2009. Fusion of epithelial cells by Epstein-Barr virus proteins is triggered by binding of viral glycoproteins gHgL to integrins alphavbeta 6 or alphavbeta8. Proc Natl Acad Sci USA，106：20464～20469

Cohen JI. 2000. Epstein-Barr virus infection. N Engl J Med，343：481～492

Hepeng J，Zeng Yi. 2008. A controversial bid to thwart the “Cantonese cancer”. Science，321(5893)：1154～1155

Li W，Moore MJ，Vasilieva N，et al. 2003. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional re-

ceptor for the SARS coronavirus. Nature, 426(6965):450～454

Scholle F, Bendt K M, Raab-Traub N. 2000. Epstein-Barr virus LMP2A transforms epithelial cells, inhibits cell differentiation, and activates Akt. J Virol, 74(22): 10681～10689

Tugizov SM, Berline JW, Palefsky JM. 2003. Epstein-Barr virus infection of polarized tongue and nasopharyngeal epithelial cells. Nat Med, 9:307～314

Walling DM, Ray AJ, Nichols JE, et al. 2007. Epstein-Barr virus infection of Langerhans cell precursors as a mechanism of oral epithelial entry, persistence, and reactivation. J Virol, 81(13):7249～7268

撰稿人:黄文林　曾木圣

中山大学

慢性乙型肝炎病毒感染过程中免疫细胞如何应答

How the Immune Cells Response to Chronic Hepatitis B Virus Infection

1. 背景

乙型肝炎病毒（hepatitis B virus，HBV）属于嗜肝 DNA 病毒属，是导致人类慢性肝炎、肝硬化和肝癌的主要病原体。乙型肝炎病毒的特点和宿主免疫功能是决定乙型肝炎病毒感染转归与结局的两个重要因素。前者决定了病毒传播和持续感染的能力，后者决定了机体能否有效控制病毒的复制和清除病毒，同时也参与了病毒致病过程。但是，对于其确切分子机制仍不清楚。此外，目前可用于乙型肝炎治疗的抗病毒药物只能抑制病毒复制，但不能彻底清除 HBV 感染。

2. 科学意义

阐明乙型肝炎病毒感染过程中 HBV 与机体免疫系统的相互作用机制，不仅有助于了解乙型肝炎发病机制，还将有助于开发新的治疗药物和新的治疗策略。

3. 最新进展

影响感染转归的病毒因素包括初始感染的滴度、病毒复制动力学和传播能力。同时病毒因素又受到机体免疫系统的制衡，包括免疫应答动力学、特异性体液与细胞免疫持续的时间及固有免疫应答的产生等。在嗜肝 DNA 病毒动物模型的实验研究中发现，病毒的接种量与感染后果有关，但是结果并不一致。如有的研究显示高滴度病毒感染的动物慢性化的比例较高；但是也有研究发现用低滴度病毒感染雏鸭或者土拨鼠可造成持续感染。这种差异的确切机制尚不清楚，可能与病毒复制能力的差异以及固有免疫应答的起始强度有关。此外，流行病学研究显示机体感染的年龄可影响感染的后果，婴幼儿感染通常更容易导致慢性化。在嗜肝 DNA 病毒动物模型中的实验研究也证实了流行病学的上述发现。新生土拨鼠和雏鸭在分别感染了土拨鼠肝炎病毒（woodchuck hepatitis virus，WHV）和鸭乙型肝炎病毒（duck hepatitis B virus，DHBV）后常导致慢性肝炎，而成年动物则通常为一过性感染。

对 HBV 感染早期，即从感染到出现临床症状前这段时间的观察发现，HBV 复制水平在临床症状出现前已显著降低。究竟是何种免疫应答机制在感染早期控制病毒复制中发挥作用呢？一般而言，病毒感染早期宿主的免疫应答包括Ⅰ型干扰素（interferon，IFN）的产生、自然杀伤细胞（natural killer cell，NK cell）

细胞的活化和病毒特异性 $CD8^+$ T 细胞的出现等。病毒可直接诱导Ⅰ型 IFN 的产生。特别是双链 RNA 结构或病毒蛋白与膜受体的相互作用可诱导 IFN-α/β 基因的高表达。然而在体外实验中 HBV 也具有抑制 IFN-β 合成的能力，并可阻断 IFN-α 介导的效应通路。由于缺乏可供 HBV 感染的体外细胞模型，对于 HBV 是如何诱导Ⅰ型 IFN 产生的机制仍不清楚。因此，尽管Ⅰ型 IFN 参与了早期控制 HBV 感染的应答，但它们在 HBV 清除中的作用仍有争议。

NK 细胞可抵御多种病毒的感染，而且在感染的初期可介导细胞毒作用并分泌 IFN-γ。在急性感染的早期阶段，急性乙型肝炎患者的外周血中可见大量的 NK 细胞，并与 HBV DNA 水平的下降存在相关性，提示 NK 细胞在控制 HBV 感染方面起到了一定的作用。但目前尚不清楚 NK 细胞能否识别被 HBV 感染的肝细胞。值得注意的是，在嗜肝 DNA 病毒感染的早期，黑猩猩和土拨鼠体内可检测到大量的 IFN-γ mRNA，随后才是 $CD3^+$ T 细胞的浸润，提示这些 IFN-γ 是由肝内活化的 NK 细胞产生的。NKT 细胞在肝脏中大量存在，占肝内总淋巴细胞的 20%～30%。但在控制 HBV 感染的过程中，NKT 细胞是否被活化以及它们在 HBV 清除中的作用尚不清楚。

总之，尽管Ⅰ型 IFN、NK 细胞、NKT 细胞和 $CD8^+$ T 细胞在 HBV 感染早期病毒清除中的作用尚待阐明，但对人类、黑猩猩和土拨鼠的研究资料显示，HBV 感染的早期不仅是病毒大量复制的时期，而且随着时间的推移，在出现临床症状之前，抗病毒细胞因子表达增加，NK 细胞和抗原特异的 CD8 细胞的出现等与 HBV DNA 水平的减低有一定相关性，提示这一时期是宿主与病原体相互作用的重要时期，可能在此期间已决定了病毒感染的转归和结局。因此，应加强对 HBV 感染早期病毒复制动力学及免疫应答动力学的深入研究。

$CD8^+$ T 细胞、$CD4^+$ T 细胞和 B 细胞是获得性免疫应答的组成部分。它们在活化后能够进入实质器官，特异地识别和清除感染细胞，通过分泌抗病毒细胞因子或抗体抑制或清除病毒，因此是机体抗病毒免疫的重要组成部分。现有研究表明，机体针对 HBV 的适应性免疫应答对于控制 HBV 传播和复制，以及最终清除病毒至关重要。病毒特异性 B 淋巴细胞产生的高亲和力的 HBV 表面抗原（hepatitis B surface antigen，HBsAg）的抗体（anti-HBs，抗 HBs）能够有效地阻断病毒与肝细胞结合，并促进病毒被巨噬细胞吞噬和清除。而 HBV 特异性的 T 淋巴细胞则可通过直接杀伤病毒生存的肝细胞，或者通过分泌细胞因子，如干扰素、肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）等作用于病毒感染的肝细胞，起到抑制病毒复制及清除病毒的作用。在 HBV 转基因小鼠中，细胞因子 IFN-γ 和 TNF-α 介导的应答可以完全抑制 HBV 的复制，而不导致肝细胞的死亡，称为非溶细胞性的杀伤机制。这可能是机体为了避免重要器官因大量细胞死亡而严重受损进化出的一种抗病毒机制。

比较急性感染后恢复的 HBV 感染者和慢性 HBV 感染者体内病毒特异性免疫应答可以发现，除了慢性感染者体内没有抗 HBs，特异性的 T 细胞应答的质与量的差异是两者之间最为显著的区别。在急性感染后恢复期的患者体内，HBV 特异性 T 细胞应答呈现为高强度和多特异性，即 T 细胞可对病毒不同蛋白上不同抗原表位产生强烈的反应。而慢性感染者体内的特异性 T 细胞应答则仅针对少数抗原表位，且反应强度很弱，甚至出现可逃避 T 细胞应答的 HBV 突变株。迄今，这种差异的详细分子机制仍未阐明。除了年龄、病毒滴度和病毒复制动力学等因素之外，其他因素如宿主的遗传背景、母婴传播感染和 HBV 蛋白等也可改变 T 细胞应答的结果。如 E 抗原（hepatitis B e antigen，HBeAg），是 HBV 的一种非结构蛋白，它具有免疫调节功能。在小鼠模型中，HBeAg 能穿过胎盘诱导抗原特异性的 T 细胞耐受。此外，HBeAg 能诱导抗原特异性Ⅰ型辅助性 T 细胞（helper T cell 1，Th1）的清除，并将免疫应答引向 Th2 为主的反应。因此，大量的 HBeAg 可抑制抗病毒免疫的有效应答，有助于病毒的持续存在。

一般认为，HBV 并无直接致细胞病变的作用，因此 HBV 感染后肝脏的损伤是由于针对 HBV 的免疫应答所致。目前的数据显示肝内浸润的病毒特异性的免疫细胞与病毒非特异性的免疫细胞、炎性细胞的比例和功能决定着肝内病毒复制水平及肝细胞受损程度。重症肝炎转基因小鼠模型和植物血凝素 A 诱导的肝炎模型显示肝脏的病理损伤与抗原非特异性 T 细胞及炎性细胞的肝内募集相关。具有正常功能的特异性细胞毒性 T 细胞（cytotoxicity T cell，CTL）于适当时间募集至适当的位置则可有效地抑制 HBV 而不会引起大量的慢性肝细胞损伤；而反应能力不强的 CTL 不仅无力清除 HBV，反而可从外周血向肝脏募集炎性细胞，后者释放的大量炎性因子引发肝内炎性坏死，使 HBV 的感染慢性化，并逐渐发展为肝纤维化、肝硬化和肝细胞癌。但是，确切的分子机制尚有待深入研究。

4. 主要难点

由于 HBV 感染具有严格的种系限制性，即 HBV 只能感染人类和高级灵长类动物黑猩猩。此外，迄今仍无法在体外长期培养 HBV，因此缺乏适当的体内外感染模型是制约 HBV 感染相关免疫学研究的重要难点。而对机体免疫应答调控机制的认识及研究方法的局限性也是该领域研究的重要难点之一。

5. 展望

随着对机体免疫应答调控机制认识的深入，尤其是天然免疫应答与适应性免疫应答间相互调控机制的阐明，以及对土拨鼠、人-鼠嵌合小鼠、人源化小鼠等 HBV 感染模型的优化与免疫学研究方法的完善，人们将会进一步了解 HBV 感染过程中免疫应答的本质和机制，开发出更有效的治疗药物。

参 考 文 献

Asabe S, Wieland SF, Chattopadhyay PK, et al. 2009. The size of the viral inoculum contributes to the outcome of hepatitis B virus infection. J Virol, 83(19):9652~9662

Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF. 2010. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. Pathol Biol(Paris),58(4):258~266

Guidotti LG, Chisari FV. 2006. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. Annu Rev Pathol,1:23~61

Maier H, Isogawa M, Freeman GJ, et al. 2007. PD-1:PD-L1 interactions contribute to the functional suppression of virus-specific $CD8^+$ T lymphocytes in the liver. J Immunol,178(5):2714~2720

Maini MK, Boni C, Lee CK, et al. 2000. The role of virus-specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. J Exp Med,191(8): 1269~1280

Rehermann B, Nascimbeni M. 2005. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. Nat Rev Immunol,5(3): 215~229

Rehermann B. 2003. Immune responses in hepatitis B virus infection. Semin Liver Dis,23(1): 21~38

Robek MD, Garcia ML, Boyd BS, et al. 2007. Role of immunoproteasome catalytic subunits in the immune response to hepatitis B virus. J Virol,81(2):483~491

Thimme R, Wieland S, Steiger C, et al. 2003. CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. J Virol,77(1): 68~76

Yang PL, Althage A, Chung J, et al. 2010. Immune effectors required for hepatitis B virus clearance. Proc Natl Acad Sci USA,107(2):798~802

撰稿人:杨东亮
华中科技大学同济医学院附属同济医院

临床医学篇

慢性心力衰竭的发病机制

Mechanisms of Chronic Heart Failure

慢性心力衰竭（简称心衰）是多种遗传和环境危险因素共同作用所致的临床综合征，是各种心血管疾病的最终归宿，是严重危害人类健康的顽疾。

在过去的2500年中，人们对心衰的认识经历了由浅入深、由表及里、由宏观至微观的漫长历程。早在古希腊和古罗马文字记载中就有关于心衰的描述：病人全身水肿、呼吸困难。希波克拉底的文集中也有这样的描述："有时当把耳朵贴至心衰病人胸壁可听到胸腔内如同烧开的醋一样的煮沸声。"公元前3世纪埃及生理学家们对心衰病人进行了尸解和生理实验，认识到心脏能够收缩以及心脏瓣膜的功能。生活在公元2世纪罗马帝国时期的希腊医生盖伦的观点认为，心脏是热能的来源，收缩期心室容量减少，动脉的搏动是通过动脉管壁传导而非通过血液在管腔内的流动而产生的，但未认识到心脏是一个泵。1628年，威廉·哈维医生最先提出了心脏是一个脉动器官的学说，心衰是全身循环障碍所致，为后人研究心衰的血流动力学异常奠定了基础。对心脏结构改变的认识可追溯到18世纪初，1745年，兰西斯（Lancisi GM）在教科书中写到：瓣膜反流可致心室扩张，但主动脉瓣狭窄却不伴心腔扩大。随着对尸解的临床应用和心脏结构的改变如心室壁肥厚、心腔扩大等认识的深化，随之而来的是，开心和瓣膜置换手术的临床应用。1918年，Starling提出了"心脏法则"，即心室舒张末容量增加可增强心脏的功效。直到20世纪末，人们才认识到：Starling心脏法则仅适用于生理性心腔容量增加产生的短期获益，而心衰时的病理性心腔扩大可致长期的不良预后。20世纪40年代心导管技术的临床应用深化了对心衰伴发血流动力学异常的认识，心衰时液体平衡失调的研究带来了利尿剂的临床广泛应用。心衰时生物化学异常的认识起源于20世纪50年代，主要集中在三个领域：心肌的能量学；心肌收缩、心肌松弛、兴奋-收缩偶联的机制和新的正性肌力药物的研发；继发心排血量降低所致的神经内分泌反应。Meerson等研究发现，负荷增加诱发的心肌肥厚具有双重性：适应性代偿肥厚和非适应性失代偿肥厚，心肌非适应性肥厚概念的提出揭开了认识心肌重构的序幕。

心衰发生发展机制的现代认识：心肌重构与神经内分泌激素细胞因子过度持续异常激活之间形成的恶性循环，导致患者出现以呼吸困难、乏力和液体潴留为主要临床表现的复杂临床综合征。心肌重构主要是指心肌细胞的肥大（厚）、坏死、

凋亡和胚胎基因或蛋白质再表达，心肌细胞外基质成分含量和比例失调。神经内分泌激素细胞因子主要包括交感神经和肾素-血管紧张素-醛固酮系统激素（如肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴胺、肾素、血管紧张素Ⅱ、醛固酮、血管加压素、内皮素、生长激素等）及众多细胞因子（如白介素家族、肿瘤坏死因子、C 反应蛋白、利尿钠肽、脂联素、生长分化因子 15、半乳凝素、骨保护素等）。

心衰发生发展的演变过程：在多种危险因素（如衰老、吸烟、高血压、高脂血症、糖尿病、肥胖和遗传因素等）的作用下，心肌细胞发生病理生理改变（肥大、梗死、凋亡过度、纤维化等），进而发生心室重构［心室肥厚和（或）扩大］，最终出现心功能不全/心衰。

阐明心衰发病机制的最大难点在于：如何在细胞和分子生物学水平梳理和阐明各种危险因素、不同生物信号转导通路/网络之间相互调节、相互影响的错综复杂关系。这种复杂性从图 1 中可窥一斑：心肌肥厚是导致心衰的重要机制之一，图 1 中仅显示调节心肌肥厚的诸多不同信号通路中的一种通路，即增殖信号通路。

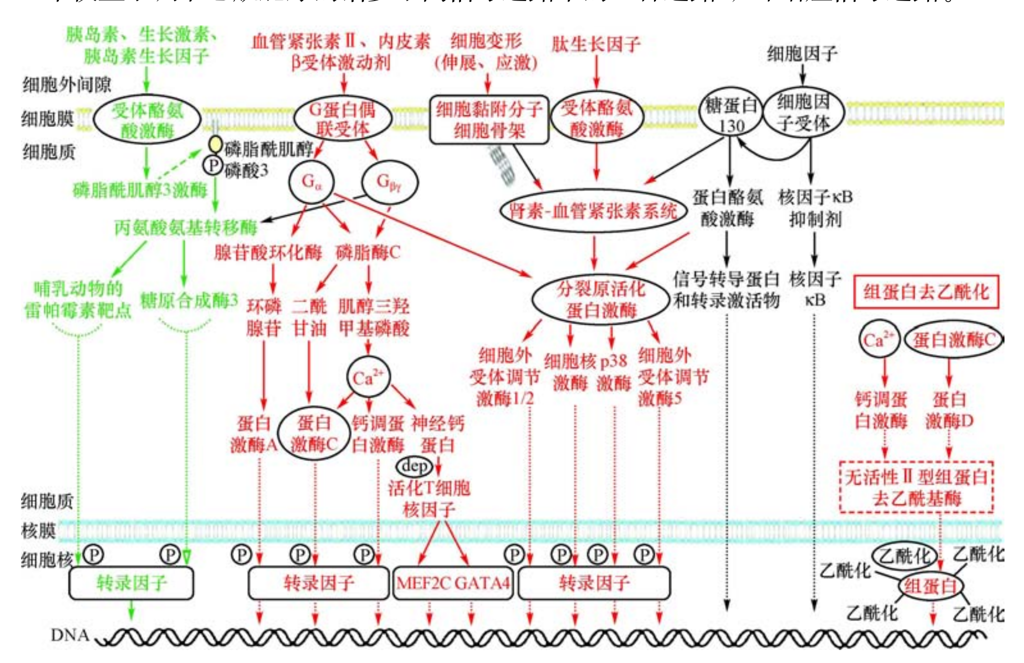


图 1　调节心肌肥厚的增殖信号通路

绿色信号通路：主要调节适应性肥厚。当胰岛素、胰岛素生长因子和生长激素与受体酪氨酸激酶结合时，激活磷脂酰肌醇-3-激酶/磷脂酰肌醇磷酸 3/丙氨酸氨基转移酶通路；红色信号通路：主要调节非适应性肥厚。β 受体激动剂、血管紧张素Ⅱ、内皮素等与 G 蛋白偶联受体结合，激活腺苷酸环化酶/磷脂酶 C 通路；黑色信号通路：细胞因子激活通路，调节适应性和非适应性肥厚。各种细胞因子与其受体结合，激活蛋白酪氨酸激酶/信号转导蛋白和转录激活物/核因子 κB 通路。细线实箭头为信号通路，虚线实箭头指磷酸化，虚线空箭头指去磷酸化

在阐明心衰发病机制和探索相应干预手段的研究中，具有前景的可行思路包括：

基因组学：业已阐明，编码肌钙蛋白 T、β-肌球蛋白重链和受磷蛋白的基因突变是导致扩张型心肌病的遗传因素；编码肌原纤维蛋白常染色体遗传的单基因突变在肥厚型心肌病患者中达 400 余个，新的单基因突变还在不断发现中；马方综合征也是单基因疾病，常因左心瓣膜反流而致心衰；可致心衰的高血压、糖尿病、血脂异常和冠心病是多基因疾病，尽管更为复杂但其基本原理与单基因疾病类似。2008 年，Braunwald 等应用 PCR 放大技术对冠心病患者染色体 DNA 研究发现，编码蛋白的基因多态性与细胞内转运子 KIF6SNP 相关，其中的基质金属蛋白酶基因 ADAMTS1 与冠脉血管事件风险显著增高密切相关，而应用他汀类药物治疗可降低这种风险。可以预期，未来 20 年随着对冠心病和高血压多基因变量研究的深化和拓展，必将改变这两种最常见导致心衰疾病的易感性并找到更具靶向性的预防手段。

遗传药理学：对某些药物反应的遗传特性在心衰病程和处理中具有特别重要的意义。例如，表现为 ACE 基因$^{-/-}$多态性的心衰患者预后较差，对 β 受体阻滞剂治疗更为有效；编码 β 受体 389 位点精氨酸的纯合子心衰患者给予布新洛尔治疗可提高其存活率；药物代谢如肝脏中 CYP 酶也与编码蛋白基因相关，基因遗传特性会改变患者对心衰药物的治疗反应。同样可以预期的是，未来 10～20 年随着遗传药理学的发展，将大大提高人们对心衰患者危险分层和选择最佳治疗的能力 。

参 考 文 献

Ashrafian H ,Frenneaux MP ,Opie LH .2007 . Metabolic mechanisms in heart failure . Circulation ,116 :434～448

Braunwald E .2008 . The management of heart failure the past , the present , and the future . Circ Heart Fail ,1 :58～62

Goldhaber JI ,Bridge JHB .2009 . Loss of intracellular and intercellular synchrony of calcium release in systolic heart failure .Circ Heart Fail ,2 :157～159

Hosoda T ,Kajstura J ,Leri A ,et al 2010 . Mechanisms of myocardial regeneration .Circ J ,74 :13～17

Ingwall JS .2009 . On the control of metabolic remodeling in mitochondria of the failing heart . Circulation : Heart Failure ,2 :275～277

Katz AM .2008 . The “modern” view of heart failure : how did we get here? Circ Heart Fail ,1 :63～71

McMurray JJV .2010 . Systolic heart failure .N Engl J Med ,362 :228～238

撰稿人：葛志明

山东大学齐鲁医院

人工心脏的感染和栓塞

Infection and Thromboembolism of Artificial Heart

药物和常规心脏手术（包括瓣膜置换、瓣膜成形、冠状动脉再血管化等）不能治愈的终末期心力衰竭，是心血管病领域的难题。目前的治疗手段为心脏替代（cardiac replacement），包括心脏移植和人工心脏。心脏移植已在全球广泛开展，但面临供体心脏来源短缺和由于慢性排斥反应造成移植心远期失功能的问题。心脏移植受体平均存活 10 年，最长 20 年。与心脏移植相比，全人工心脏（total artificial heart，TAH）有不受供体心脏来源限制的优势，可以代替心脏移植，也可用于某些不适合行心脏移植的病例。

早在 1812 年，LeGallois 就提出了开发永久性或暂时性心脏辅助设备的想法。1920 年，Lindbergh 和 Carrel 曾计划设计人工心脏。1953 年，Gibbon 用自己设计的体外循环机（heart-lung machine）为一例 18 岁女性病人施行了房间隔缺损修补，将人工心脏支持生命的设想变为现实，目前心脏外科手术所用的体外循环机仍是按 Gibbon 基本设计原理改进制造的，但体外循环机是一个体积庞大的机器，只能用于短时间替代心肺功能进行心脏直视手术而不能置入体内。1957 年，Kolff 将气动人工心脏置入犬体内，该犬存活 90 分钟。1963 年，DeBackey 首次将心室辅助装置置入体内，治疗一例因心脏瓣膜置换术后心源性休克的病例，但术后 4 天病人死亡。1966 年，DeBakey 又用心室辅助装置治疗一例心脏直视术后心源性休克的病例，辅助 10 天获得成功。1982 年，牙科医师 Barney Bailey Clark 是第一个接受永久性全人工心脏（Jarvik-7）置入的患者，术后存活 112 天。1983 年，第二个永久性人工心脏置入的患者 Bill Schroeder 术后存活 620 天，创造了当时之最。

广义的人工心脏，也包括心室辅助装置（ventricular assist device VAD）。按辅助时间可分为：①短期辅助（VAD）；②长期辅助（VAD）；③永久性辅助（TAH）。短期辅助适用于自体心脏功能经短期（两周之内）辅助后能恢复者，如心脏手术后心功能衰竭不能脱离体外循环者、暴发性心肌炎、大面积心肌梗死、心源性休克等。该装置价格便宜，设备较简单，并发症相对较少。长期辅助适用于严重心功能衰竭，面临死亡，需心脏移植，但近期无法得到合适供心的患者，称作心脏移植过渡治疗（bridge to heart transplantion）。由于需要较长时间的辅助，设备较复杂，并发症较多。永久性全人工心脏适用于严重心功能衰竭而又不能行心脏移

植的患者，作为终末治疗手段。随着医学科学、材料科学、电子及机械工程科学的飞速发展，可置入永久性全人工心脏，在心脏替代治疗上有美好的前景。但是，全置入人工心脏设计复杂，各方面的要求甚高，仍有许多要解决的难题。

一般心室辅助装置的能源有气动和电动两种，排血方式有搏动性射血（类似正常心室射血）和连续非搏动排血（axial flow pump，轴流泵）两种，多存在穿出皮肤的能量供应系统、排气管道，限制病人的活动范围，易于感染等问题。而理想的可置入全人工心脏应有良好的组织相容性，不间断的、内置的能量供应系统。目前有代表性的全人工心脏是 2006 年获得美国 FDA 临床使用准入的 Abiomed 公司设计制造的 Abiocor 系统。

该系统的胸内部分包括泵体（两个心室）、经皮充电系统（transcutaneous energy transfer，TET）线圈、控制器、蓄电池。泵体由两个心室、4 个瓣膜组成，重量约 900g。动力来自每分钟 6000～8000 转的电机，驱动液压系统推动血室的隔膜挤出血液。体内蓄电池经 TET 系统充电，外电源中断时，可维持 30 分钟的供电能力。体外部分包括微电脑控制器、外置 TET 充电线圈、外置蓄电池。外置微电脑控制器经无线电波（radiofrequency communication system）调整体内控制器，调节心率和左、右室排血的平衡等参数。平时由体外 TET 线圈提供电能，TET 线圈供电中断时，外置蓄电池可提供 2～4 小时供电能力。病人能以正常人生活质量存活，目前最长存活时间为 512 天（图 1）。

图 1　置入体内的 Abiocor 模式图

1. 无线能量转换器；2. 外置无线驱动器；3. 泵体；4. 内置蓄电池；5. 内置控制器；6. 外置蓄电池

第一代全人工心脏，驱动和控制系统体积庞大，只能放在体外，经管道和导线与病人连接，病人的活动范围受到极大限制，不能离开监护室。第二代全人工心脏，大部分部件可置入体内，驱动和控制系统体积大大缩小，经皮穿出导管和导线与体内部分连接，病人在置入后可出院，存活 1～2 年。第三代新型人工心脏，充分考虑病人的舒适性，避免经皮穿出管道和导线，以减少感染发生率。体积较小的轴流泵似乎占优势。

作为终末治疗的全人工心脏，要保证病人长期高质量存活，面临 3 个主要问题。

1. 感染

人工心脏置入体内后即成为血液循环的中心，很易发生致命性的感染，尤其

是有经皮穿出驱动、控制导线和管道者，更易发生感染，感染发生率在20%上下。第三代新型全置入人工心脏，应用TET供应电能，避免了经皮穿出导管和导线，大大降低了感染发生率，但供电时间有限。

2. 能源

目前所用的蓄电池供电时间仍太短，病人不能长时间远离固定的充电设备。今后应在三方面进行探索。①设计耗能小的人工心脏；②缩小蓄电池体积和重量，提高其能量储备；③寻找其他小体积、高效能源。

3. 栓塞

尽管新一代人工心脏采用目前最好的组织相容性材料，但人工心脏的瓣膜、血室、驱动叶片（轴流泵）仍可导致血小板和其他凝血物质沉积而形成血栓。血栓脱落则造成栓塞。因此，置入人工心脏后均需用肝素和华法林抗凝血治疗。在应用抗凝血治疗的情况下，仍有10%～15%的血栓栓塞率。抗凝血治疗过度，可造成出血，严重者造成病人死亡，或造成残疾。研制组织相容性优良的新型人工心脏，避免抗凝血治疗，或寻找新的既能达到抗凝目的又无出血之虞的抗凝血治疗药物是较好的解决办法。

参考文献

Boilson BA, Raichlin E, Park SJ, et al. 2010. Device therapy and cardiac transplantation for end-stage heart failure. Curr Probl Cardiol, 35(1): 8～64

Copeland JG, Smith RG, Arabia FA, et al. 2001. Comparison of the CardioWest total artificial heart, the novacor left ventricular assist system and the thoratec ventricular assist system in bridge to transplantation. Ann Thorac Surg, 71(3 Suppl): S92～S97

Copeland JG, Smith RG, Arabia FA, et al. 2000. The CardioWest total artificial heart as a bridge to transplantation. Semin Thorac Cardiovasc Surg, 12(3): 238～242

DeVries WC. 1988. The permanent artificial heart: four case reports. JAMA, 259: 849～859

Gibbon JH. 1954. Application of a heart and ling apparatus to cardiac surgery. Minn Med, 37: 171～185

Mitter N, Sheinberg R. 2010. Update on ventricular assist devices. Curr Opin Anaesthesiol, 23(1): 57～66

撰稿人：吴树明
山东大学齐鲁医院

易损斑块能够识别吗

Could We Identify the Vulnerable Plaque

心脑血管病是全球第一位的死亡原因。易损斑块破裂是急性心血管病事件的主要发病机制，约70%的致命性急性心肌梗死和（或）冠心病猝死是由易损斑块破裂引起的。早期识别易损斑块对于心血管病事件的防治具有重要的临床意义。易损斑块的诊断标准包括：

(1) 主要标准：①活动性炎症（单核细胞/巨噬细胞间或T细胞浸润）；②大脂质核，薄纤维帽；③内皮脱落，表面血小板聚集；④斑块裂隙；⑤狭窄程度>90%。

(2) 次要标准：①表面钙化结节；②斑块呈亮黄色；③斑块内出血；④内皮功能异常；⑤血管正性重构。

目前，由于缺乏准确可靠的检测识别方法，国内外均缺乏针对易损斑块的前瞻性人群研究，因此严重限制了由易损斑块破裂导致的急性心血管病事件的早期预防和治疗。虽然目前采用综合的影像学技术和生物学标记物为易损斑块的检测提供了新的思路，但是采用何种指标、方法和技术简单可靠地检出易损斑块仍然是有待解决的难题。

1. 生化标志物在识别易损斑块中的应用

根据患者的危险因素进行危险分层能够判定更易发生心肌梗死或缺血性脑卒中的患者，这种根据大规模临床试验获得的危险分层在人群水平上具有诊断价值，但对于个体而言仍缺乏特异性。许多研究试图通过外周血采样检测可能的生化标志物判断预测临床事件的可能性及价值。目前关于识别易损斑块的生化标志物的研究主要涉及以下几个方面：炎性标志物，如CRP、sCD40L、MCP-1、sPLA2、MPO、IL-6、TXB2等；凝血及纤溶指标，如纤维蛋白原、D-二聚体；内皮功能和氧化应激标志物，如同型半胱氨酸等。目前对于血清中高滴度的斑块源性标志物以反映易损斑块的总体水平如白介素6（IL-6）、基质金属蛋白酶9（MMP-9）和妊娠相关血浆蛋白A（PAPP-A）均有报道，但其临床价值仍有争议。目前对于生化标志物的临床应用仍存在以下问题：①标志物测值的重叠性，在临床试验大样本人群中观察到与临床事件相关的指标，但在实际测量中正常与异常、不同危险分层间有较大的重叠性，因此难以在个体中确定特定标志物预测冠心病事件的价值；②临床研究应用的相对危险比只能反映心血管病事件的发生

情况，不能预测心血管病事件发生的危险程度；③生化标志物指标的特异性、敏感性和稳定性均影响对心血管事件的预警能力；动脉粥样硬化发病机制复杂，如何结合基础和临床研究开发反映易损斑块特异性、敏感性和稳定性高的标志物仍然是需要解决的难题。这些问题对筛选更具价值的血清生物标志物提出了新的挑战。

2. 影像学技术在识别易损斑块中的应用

影像学技术在心血管病预警中的作用主要是根据已有的器质性病变预测临床事件发生的可能性。多层螺旋CT检查时间短，容积再现技术则可显示动脉管腔面、血管狭窄程度，以及突出于血管内壁的附壁血栓、钙化斑、软斑等。但CT对软组织分辨率相对较低，易受容积效应的影响，对动脉粥样硬化斑块（如软斑）的显像仍有待提高。系列研究证实MRI对于监测斑块发生和组分的动态改变具有重要价值，频谱MRI能够识别人活体内动脉粥样硬化斑块富含脂质的坏死核心和最近的斑块内出血，高分辨率、多重对比加权像MRI能够识别纤维帽的形态学特征，尤其能够清晰显示纤维帽的破裂。但MRI成像时间长达数十分钟以上，成功率仅有70%左右。如何快速成像和提高成像的成功率仍然是需要研究的难题。

高频体表超声分辨率较低，因此关于斑块纤维帽厚度的测量和组织成分的成像仍然困难。血管内超声成像（IVUS）能较准确地识别脂质核与钙化成分，但对纤维组织的识别力欠佳。IVUS射频信号振幅和频率信息的融合称为虚拟组织成像。与病理学结果的对照研究显示，该技术检测纤维、纤维脂肪组织和坏死核心的敏感性分别为76.1%、46%和41.1%，不能识别炎性活动和斑块纤维帽厚度等决定斑块易损性的重要因素。OCT是一种可观察易损斑块纤维帽的有创技术，OCT技术的分辨率可到达10μm，分辨厚度＜65μm的纤维帽的敏感性与特异性均接近100%，对于检测脂质核心、钙化和巨噬细胞浸润的敏感性与特异性可在90%以上。但这一技术测量指标的预测价值仍然需要研究。

易损斑块的识别不仅需要传统的斑块形态学信息，更需要斑块形变、炎症和代谢活动等功能信息。血管内超声弹性图（elastogram）与内膜硬度图（palpogram）可用于斑块力学特性的评价。研究显示，弹性图对斑块形态的测量结果比IVUS更接近于病理结果。由于斑块是不规则的三维形态，在外力作用下，各部位形变的大小和方向是如何变化的、如何显示斑块的三维应变改变仍然是需要解决的难题。局部炎性活动的强弱是判断斑块易损性的重要指标，作为基于对病变传统成像技术的补充，分子成像能够借助靶向性探针识别特定的分子靶标、信号通路和分子过程。但目前仅有极少数分子成像方法能成功应用于临床，可能因为很多分子靶点缺乏特异性，分子探针与靶标的结合率和局部的有效浓度较低难以显像。纳米分子成像技术的研究将促进该方向研究的发展。

由于易损斑块形态结构复杂，现在还没有一种方法可以单独提供易损斑块特征的全面信息。结合影像学新技术和斑块源的特异性生物学标志物将为易损斑块的早期检测提供更为可靠的方法。

参考文献

Ding S, Zhang M, Zhao Y, et al. 2008. The role of carotid plaque vulnerability and inflammation in the pathogenesis of acute ischemic stroke. Am J Med Sci, 336(1): 27～31

Eggers KM, Lagerqvist B, Venge P, et al. 2009. Prognostic value of biomarkers during and after non-ST-segment elevation acute coronary syndrome. J Am Coll Cardiol, 54(4): 357～364

Honda Y, Fitzgerald PJ. 2008. Frontiers in intravascular imaging technologies. Circulation, 117(15): 2024～2037

Kaski JC. 2010. C-reactive protein improves risk prediction in patients with acute coronary syndrome, or does it? Eur Heart J, 31(3): 274～277

Kempf T, Sinning JM, Quint A, et al. 2009. Growth-differentiation factor-15 for risk stratification in patients with stable and unstable coronary heart disease: results from the AtheroGene study. Circ Cardiovasc Genet, 2(3): 286～292

Rodriguez-Granillo GA, Agostoni P, et al. 2006. In-vivo, cardiac-cycle related intimal displacement of coronary plaques assessed by 3-D ECG-gated intravascular ultrasound: exploring its correlate with tissue deformability identified by palpography. Int J Cardiovasc Imaging, 22(2): 147～152

Schaar JA, Mastik F, Regar E, et al. 2007. Current diagnostic modalities for vulnerable plaque detection. Curr Pharm Des, 13(10): 995～1001

Wang Y, Li L, Tan HW, et al. 2007. Transcoronary concentration gradient of sCD40L and hsCRP in patients with coronary heart disease. Clin Cardiol, 30(2): 86～91

Zhang PF, Su HJ, Yao GH, et al. 2009. Plaque volume compression ratio, a novel biomechanical index, is independently associated with ischemic cerebrovascular events. J Hypertens, 27(2): 348～356

撰稿人：张　梅　张　运

山东大学齐鲁医院

右心房在房颤发生、发展中的作用

Role of Right Atrium in Onset and Development of Atrial Fibrillation

心房颤动（简称房颤）的非药物治疗是近年来电生理领域中的研究热点。目前，阵发性房颤的射频消融成功率基本在80%～90%，但对持续性房颤和永久性房颤的成功率仍较低，且存在一定的复发率，远期成功率偏低。其中，慢性持续性房颤患者的比例显著高于阵发性房颤。因此，如何提高慢性持续性房颤的射频消融成功率备受关注，从而引发了关于房颤机制的深入研究。

房颤一直被认为是左心房疾病，左心房结构重构在房颤的维持中扮演重要角色。长期以来，人们一直把研究房颤机制的焦点集中在左心房，而忽略了右心房的地位。右心房内的特殊结构和右心房基质改变是否与心律失常的发生和发展密切相关？这是近年来困扰学者们的难点。

近年来，随着电生理技术的发展，已有研究者发现，局灶性房颤的部分异位兴奋点位于右心房；针对右心房的射频消融能够成功地去除部分难治性房颤。这就提示我们重视右心房在房颤发病机制中的地位，开拓射频消融治疗房颤的手术新视野，将提高房颤射频消融的成功率。可见，右心房在房颤的发生中具有一定的地位。针对右心房的消融治疗房颤不能废弃，当前应该考虑到的是什么情况下消融右心房？采取什么样的消融径线较为合适？这些问题均有待于对右心房进行更深入的研究。正确评价右心房的结构、功能和血流动力学改变对于监测房颤的进展及预后等具有重要的意义。从右心房的结构、功能及血流动力学方面着手深入探讨其在房颤发生中的作用，有望确立右心房对房颤发生发展的贡献。

首先，右心房的特殊结构可能是房颤发生的生理学基础。右心房大致呈立方形，成人容量约57ml，壁厚约2mm，正常接受来自上腔静脉、下腔静脉和冠状静脉窦的回流血液，右心房由右心耳、心房体部和窦部组成，右心耳相对左心耳短小，呈三角形，基底部宽大，右心耳内有梳状肌，延续至心房体部，止于界嵴。界嵴为右心房体部和窦部的分界线，与心房外部的界沟相对应，自上腔静脉入口的前面伸至下腔静脉入口的前面，在界嵴后面的心房壁光滑，为心房窦部，在界嵴前面的心房为心房体部，有高低不平的梳状肌分布。下腔静脉至三尖瓣环之间为右心房峡部。右心房的前下方为三尖瓣，是右心房的唯一出口。有研究显示，界嵴是部分房颤发生的重要基础，在界嵴后缘和界嵴-梳状肌分界处存在两个单向阻滞区，右心房内的电传导不能跨越阻滞区而形成折返环，导致心房扑动形成，如果传导阻滞

的范围缩小，折返环也缩小且不稳定，向周边弥散，即导致房颤发生。

其次，右心房可能发生的结构重构也是房颤发生维持的病理基础。慢性房颤动物模型证实，右心房结构重构在房颤的维持中可能具有重要地位。表现为快速心房起搏一周时右心房即同左心房一样呈显著扩大有助于房颤的发生和维持；心房肌超微结构改变显著，心肌细胞肥大、坏死，肌原纤维丢失，糖原积聚，线粒体大小和形状改变，染色质离散等；心房胶原含量也明显增加，心肌间质纤维化。不难想象，右心房结构重构是房颤在右心房能够维持的重要机制，但同时右心房的结构重构能否启动并维持房颤，目前还有待于进一步研究。当右心房的基质重构足以使房颤得以维持时，单纯消融左心房不能消除房颤，这可能是目前慢性房颤消融成功率较低的原因之一。

正确评价右心房的功能和血流动力学改变对于探讨右心房在房颤发生机制中的作用可能具有追本溯源的作用。右心房与左心房类似，主要有三个功能：右心室收缩期收集并储存上、下腔静脉回流血的储存器功能；右心室舒张早期将腔静脉血流输送至右心室的管道功能；右心室舒张晚期主动收缩以增强心室充盈的助力泵功能。右心房功能在各种生理及病理状态下发挥其调节右心室充盈和维持整体心搏量的重要作用。右心房的功能与血流动力学在房颤发生后均发生紊乱。功能的改变早于器质性病变的发生，如何早期评价右心房功能的改变是目前困扰我们的难题之一。心房压力-容积（面积）关系被认为是最精确最具代表性的反映心房功能和血流动力学改变的指标，但是目前心房压力的获取需采用心导管方法。因此，多数应用心房压力-容积环评价心房功能的资料来源于动物实验。近年来，超声心动图的发展为评价心房结构、功能和血流动力学方面提供了无创性方法，使有关心房的研究从基础走向临床。特别是声学定量技术（acoustic quantification，AQ），利用自动边缘检测原理能实时显示心腔面积-时间曲线、容量-时间曲线及其微分曲线，为心房功能的评价开辟了新途径。利用 AQ 技术可以测量多项指标，如反映储存器功能的心房存储容积（RV）、峰值充盈率(PFR)；反映管道功能的心房快速排空分数（REF）、峰值快速排空率(PRER)；反映助力泵功能的心房主动收缩排空分数（AEF)、峰值心房排空率(PAER）等。然而，多数相关研究集中在左心房，有关右心房的功能研究报道甚少，有待于进一步在动物模型及临床试验中利用新兴技术准确评估右心房的变化。

最后，左、右心房为一整体，需要整体考虑心房的改变，尤其是左、右心房在功能改变方面的不同步具有重要意义。已有研究证实，代谢性因素和血流动力学因素均能造成左心房和右心房的收缩不同步。这种心房内和心房间的收缩不同步起源于电重构还是结构重构，目前尚不清楚。但是不同步的出现对于房颤来说可能具有重要的预测意义。早期检测左、右心房之间的不同步性是综合判断左、

右心房在功能和血流动力学方面改变的重要途径。速度向量成像技术（VVI）的应用给我们以新的启示。VVI是新近推出的研究心肌结构力学、分析局部心功能的超声新技术，能提供独特的心肌运动成像方式，客观精确地展现出心脏收缩与扭转运动，更完整地表达心脏射血动力，准确定量心脏容积及射血功能。上述功能或许对我们分析心房的助力泵、存储、管道功能提供新的无创途径。尽管VVI是综合利用心电活动和机械活动评价心肌的功能，具有无创性，但是作为超声的单一切面，VVI不能整体评估各个方向的心肌运动。因此，如何早期无创性整体评价心房的功能和血流动力学改变仍然是目前的最大难题。

综上所述，右心房在房颤发生发展中的地位和作用尚未完全阐明，如何全面准确早期无创地从结构、功能和血流动力学方面进行相应的研究是目前的主要方向。

参考文献

钟明,张运,张薇,等.2001.声学量技术对肥厚型心肌病患者左心房功能的评价.中华超声影像学杂志,10(10):633～634

周自强,胡大一,陈捷,等.2004.中国心房颤动现状的流行病学研究.中华内科杂志,43(7):401～494

Gaynor SL, Maniar HS, Prasad SM, et al. 2005. Reservoir and conduit function of right atrium: impact on right ventricular filling and cardiac output. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 288(5):H2140～H2145

Goya M, Ouyang F, Ernst S, et al. 2002. Electroanatomic mapping and catheter ablation of bread-throughs from the tight atrium to the superior vena cava in patients with atrial fibrillation. Circulation, 106(11):1317～1320

Maniar HS, Prasad SM, Gaynor SL, et al. 2003. Impact of pericardial restraint on right atrial mechanics during acute right ventricular pressure load. Am J Physiol Heart Circ Phyxiol, 284(1):H350～H357

Sanders P, Jais P, Hocini M, et al. 2004. Electrical disconnection of the coronary sinus by radio-frequency catheter ablation to isolate a trigger of atrial fibrillation. J Cadiovasc Electrophysiol, 15 (3):364～368

Stefanadis C, Kourouclis C, Stratos C, et al. 1990. Retrograde left atrial catheterization with a new steerable cardiac catheter. Am Heart J, 119(2 Pt 1):375～380

Waldo AL. 1998. Pathogenesis of atrial flutter. J Cardiovasc Electrophysiol, 9(8suppl):s18～s25

Yamane T, Miyanaga S, Inada K, et al. 2004. A focal source of atrial fibrillation in the superior vena cava: isolation and elimination by radiofrequecy ablation with the guide of basket catheter mapping. J Intev Card Electrophysiol, 11(2):131～134

撰稿人：张　薇
山东大学齐鲁医院

损伤修复机制与肺纤维化调控：我们的路还有多远

Wound Healing Mechanisms and Regulation of Pulmonary Fibrosis：How Far Are We from the Hilltop

肺（lungs）位于胸腔内纵隔两侧，左右各一。《素问·六节脏象论》上说“肺者，气之本”，也就是说肺脏是进行气体交换的器官。中医理论同时认为“肺为娇脏”，易受损伤。由于肺脏经气道和大气相通并经血液和体循环相交联，因此，外界环境及体循环中的多种有害刺激（如细菌、病毒、有机粉尘、无机颗粒、烟雾以及循环中各种毒素等）均可造成肺损伤，使肺脏成为易损脏器。肺组织损伤导致肺组织内环境紊乱，多种自稳态系统失衡，如炎症/抗炎系统、凝血/抗凝/纤溶系统、细胞再生/凋亡系统、血管再生/再生抑制系统、促纤维化/抗纤维化细胞因子（生长因子或趋化因子）等，最终导致肺脏发生纤维化应答反应。

肺纤维化以肺组织成纤维细胞增生和过量胶原沉积为特征，是各种已知或未知原因所致肺脏损伤与修复反应失衡的结果。肺纤维化是以特发性肺纤维化（idiopathic pulmonary fibrosis，IPF）为代表的各种异质性间质性肺疾病的共同病理改变，是导致这类疾病不可逆发展致呼吸衰竭、死亡的主要原因。IPF 发病原因不明，患病率呈上升趋势，达（14～42.7）/10 万人口，对目前采用的糖皮质激素和免疫抑制药物治疗几乎无反应，除了肺移植外，尚无有效的治疗方法，预后极差，中位生存时间 2.8 年。因此，长期以来，因各种急、慢性肺损伤修复不全所致的纤维化性肺疾病是肺科医生面临的严峻挑战。

难点之一：肺纤维化的机制——寻找“阿喀琉斯脚踵”（the heel of Achilles）

学术界对 IPF 发病机制一直存有争议。早期认为炎症反应导致的炎性细胞浸润及促纤维化因子释放是 IPF 的始动因素，因此认为阻断炎症反应即可阻断纤维化进程，这便是“炎症假说”。目前该假说是临床上将糖皮质激素和免疫抑制剂作为一线治疗 IPF 的理论基础。慢性炎症假说目前受到了严峻的挑战。许多 IPF 患者病理学改变中炎症反应并不明显，实验室研究也表明 IPF 可独立于炎症反应而发生，且应用糖皮质激素的抗炎/抗免疫治疗也并不能明显地改善肺部纤维化程度。因此，人们认为慢性肺泡损伤导致的上皮细胞之间以及上皮与间质细胞之间异常的联系和反应导致了纤维化的发生。实质器官纤维化是由损伤修复应答反应失控所致。修复过程包括两种模式：一种是再生相（regeneration phase），即受损或死亡细胞被同种类型的再生细胞所代替，损伤修复完全有序；

另一种则为纤维增生相/纤维化相（fibroplasia/fibrosis phase），即结缔组织代替了正常的实质组织，修复紊乱无序。后者是机体不经济的代偿修复方式，最终导致细胞外基质重塑和瘢痕形成，引起器官衰竭和个体死亡。

损伤愈合的三相模型包括损伤（injury）、炎症反应（inflammation）和修复（repair）。每个或多个环节出现调节异常均可导致纤维化发生。慢性炎症导致多种细胞因子、生长因子、趋化因子表达失调、细胞招募紊乱，导致肺局部微环境紊乱，形成纤维化应答的“完美风暴”（perfect storm）。在这种持续异常的内环境下，精细调节的正常损伤愈合过程逐渐演化为致纤维化病理性应答过程，逃避了损伤修复的主要检验点，导致炎症纤维化进程失控。

难点之二：肺纤维化的逆转——肺纤维化是“不归之路”（point of no return）吗

上皮细胞凋亡、内皮屏障破坏、TGF-β_1 和其他生长因子的释放、炎症介质及炎症细胞的募集、成纤维细胞/肌成纤维细胞过度活化都可致实质器官胶原产生和纤维化。肺纤维化逆转的条件是：消除慢性损伤；TGF-β_1 信号通路灭活；其他促炎症细胞因子表达降低。晚期肺纤维化能否发生逆转，重建正常的组织结构尚存在争议。事实上，诸多证据表明，如果纤维化进展到一定程度，逆转已几乎不可能。晚期纤维化肺组织内的细胞成分已然很少，基质金属蛋白酶（matrix metallo proteinase，MMP）来源不足，沉积的细胞外基质（extracelluar matrix，ECM）降解减少，导致纤维化不可逆转。况且晚期纤维化 ECM 广泛交联，并富含弹性纤维，降解较为困难。巨噬细胞缺乏可延缓 ECM 降解过程，表明巨噬细胞可能是产生 MMP 的重要来源，因此从这一点看来，炎症细胞的持续存在或许对降解沉积的 ECM 有益。

哺乳动物信号“开关”（on and off）调节间的平衡对维持自身稳态非常重要。肺纤维化中存在多种“阴”与“阳”的失衡（图 1），如果重建阴阳平衡，或许会逆转肺纤维化过程。

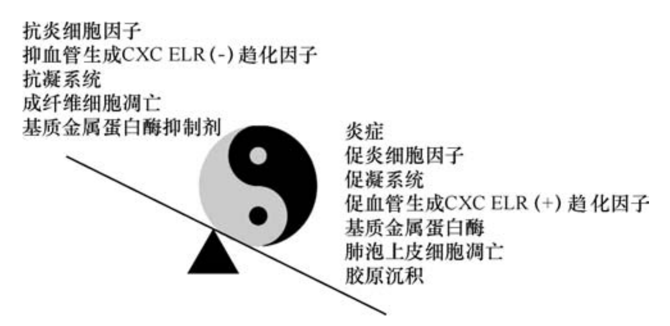


图 1　肺纤维化是异常损伤修复过程的结果，存在多种稳态系统失衡

（1）炎症/免疫抑制：去除诱发或炎症事件（如使用糖皮质激素）可能会重建平衡。同时亦应注意用药的时机和靶向问题，重建 Th1/Th2 型细胞因子网络平衡。

（2）MMP/TIMP：MMP 可破坏基底膜并导致炎症细胞浸润。抑制 MMP 活性可促进上皮再生。同时亦应注意 MMP/TIMP 失衡的空间异质性，正确纠正两者之间的失衡状态。

（3）成纤维细胞凋亡/增殖：重新建立成纤维细胞凋亡途径或抑制上皮细胞凋亡可能会抑制纤维化进展。

（4）ELR^+ /ELR^- 的 CXC 趋化因子：ELR^+ 趋化因子不断产生可以导致过度的再生血管化。抑制 ELR^+ CXC 或增强 ELR^- CXC 趋化因子的活性或能阻断炎症级联反应，延缓肺纤维化。

难点之三：从动物实验到临床应用（from bench to bedside）——**任重而道远**

虽然目前肺纤维化的发病机制尚未十分明了，但多种调节因子和信号通路的发现为开发新型抗纤维化药物开创了前景，包括细胞因子和趋化因子拮抗剂、血管生成因子抑制剂、TGF-β 信号通路调节因子、干细胞/前体细胞移植等。如何将已经获得的实验室信息准确地嫁接到临床，这还需要走很远的路。其中，最大的问题是如何设计精确的临床试验和准确的临床终点，并用非侵袭性指标（如血清标志物、先进的成像技术和临床特异性表现等）准确反映疾病的进展过程。因此，人们对肺纤维化的认识目前还处在“盲人摸象”或“坐井观天”阶段，如何进一步隐去其神秘面纱，最终拨云见日，尚需付出很大的努力。

参 考 文 献

du Bois RM .2010 .Strategies for treating idiopathic pulmonary fibrosis . Nat Rev Drug Discov , 9(2):129～140

Gharaee-Kermani M ,Gyetko MR ,Hu B ,et al .2007 .New insights into the pathogenesis and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: a potential role for stem cells in the lung parenchyma and implications for therapy . Pharm Res ,24(5):819～841

Gharaee-Kermani M ,Hu B ,Phan SH ,et al .2009 .Recent advances in molecular targets and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: focus on TGFbeta signaling and the myofibroblast . Curr Med Chem ,16(11):1400～1417

Noble PW , Homer RJ .2005 . Back to the future historical perspective on the pathogenesis of idiopathic palmary fibrosis .Am J Respire Cell Mol Biol ,33(2):113～120

Raghu G , Weycker D , Edelsberg J ,et al .2006 . Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis .Am J Resp Crit Care Med ,174(7):810～816

Strieter RM, Mehrad B.2009.New mechanisms of pulmonary fibrosis.Chest,136(5):1364～1370
Wilson MS, Wynn TA.2009.Pulmonary fibrosis:pathogenesis,etiology and regulation.Mucosal Immunol,2(2):103～121

撰稿人:代华平　王　辰
首都医科大学附属北京朝阳医院、北京呼吸疾病研究所

气道高反应性的发病机制

The Pathogenesis of Airway Hyperresponsiveness

气道反应性（airway responsiveness）指气道对各种物理、化学、变应原或运动的反应程度。正常人的气道对上述微量刺激并不引发平滑肌收缩或仅发生微弱收缩反应；而在同样刺激下，支气管哮喘（简称哮喘）患者的气道则可处于过度反应状态，表现出敏感而过强的气管平滑肌收缩反应，引起气道缩窄和气道阻力增加，从而引发喘息、胸闷和咳嗽等症状，这称为气道高反应性（airway hyperresponsiveness，AHR）。AHR是哮喘的重要特征之一，是气道存在炎症的间接反映。然而出现AHR者并非都是哮喘，其他一些病理生理状态下，如长期吸烟、接触臭氧、上呼吸道感染、慢性阻塞性肺疾病（COPD）、过敏性鼻炎、支气管扩张、热带肺嗜酸粒细胞增多症和过敏性肺泡炎、左心衰等患者也可出现AHR，所以应该全面地理解AHR的临床意义。

能否通过抑制气道高反应性从而遏制哮喘的发生发展，寻找更有效的控制哮喘的治疗方法，这是医学界面临的一大难题，具有重要意义。

但到目前为止，气道高反应性的发病机制尚未明了，炎症、神经因素等均涉及其中。此外，AHR常有家族聚集倾向，因此遗传因素在其中的地位也不容忽视。

1. 炎症

目前普遍认为气道炎症是导致气道高反应性最重要的机制之一。当气道受到变应原或其他刺激后，由于多种炎症细胞、炎症介质和细胞因子的参与，气道上皮和上皮内神经的损害等而导致AHR。也有研究显示，气道基质细胞内皮素的自分泌及旁分泌，以及细胞因子特别是肿瘤坏死因子-α（TNF-α）与内皮素相互作用在AHR的形成上有重要作用。

气道高反应性程度与气道炎症密切相关，但两者并非等同，也非简单的因果关系。

2. 神经因素

主要与神经调节的紊乱有关，特别是自主神经功能紊乱尤受人们重视。气道平滑肌受交感神经和副交感神经双重支配，在大脑皮质-下丘脑-垂体的调节下保持着动态平衡，正常人气道平滑肌张力几乎都取决于胆碱能受体的兴奋状态，而哮喘患者则不同，他们的副交感神经张力增高，α肾上腺素能神经活动增强，

β上腺素能神经功能低下或被部分阻滞等。除此之外，还存在非肾上腺素能非胆碱能（NANC）神经系统。NANC 抑制神经系统是产生气道平滑肌松弛的主要神经系统，其神经递质尚未完全阐明，可能是血管活性肠肽（VIP）和（或）肽组胺酸甲硫胺酸，而气道平滑肌的收缩可能与该系统的功能受损有关。近年的研究显示，一氧化氮（NO）是人类 NANC 的主要神经递质，而内源性 NO 对气道有双重作用，一方面，它可以松弛气道平滑肌和杀伤病原微生物，在气道平滑肌张力调节和肺部免疫防御中发挥重要作用；另一方面，局部大量 NO 产生又可加重气道组织损害而诱发 AHR，其作用可因局部组织浓度及靶部位不同而异。因此，NO 好似一柄“双刃剑”，调节着气道反应性，一旦异常可导致 AHR。因此，调节气道 NO 的生成可能有益于哮喘的治疗。

3. 病毒

流行病学调查显示，病毒感染与气道高反应性关系较为密切。婴幼儿毛细支气管炎 80% 由呼吸道合胞病毒感染所致，年长儿 60% 的急性呼吸道疾病的病原体为鼻病毒。动物实验也证实，鼻内滴入流感病毒、鼻病毒、呼吸道合胞病毒均可使小鼠产生气道高反应性。其机制尚不明确，可能为 IgE 介导的Ⅰ型变态反应、气道上皮损伤、胆碱能神经亢进、β肾上腺素能受体功能降低等多种因素作用的结果。近年来的研究发现呼吸道广泛存在神经肽网，因此病毒感染引起的神经-受体失衡机制在气道高反应性产生中的作用日趋重要。今后我们可以应用更先进的分子探针技术，以及从生化改变及电生理改变的角度进一步研究气道高反应性与神经-受体失衡的关系，使对病毒引起气道高反应性产生的神经-受体失衡机制有一个全面、完整、系统的认识。

4. 遗传

遗传因素与气道高反应性密切相关，研究证明，在哮喘患者的无症状直系亲属中气道高反应性者较对照组明显增高。在有哮喘家族史而无临床症状的正常儿童，其气道对乙酰甲胆碱和组胺的反应性也有不同程度的增高，某些特应性患者在未发生哮喘以前就可表现出气道高反应性，这些现象提示了哮喘患者的气道高反应性也受到遗传基因的控制。

除此之外，改变气道平滑肌舒缩反应和气道炎性反应的药物以及精神紧张、气愤和恐惧等心理因素亦可影响气道反应性。另外，气候、吸烟等也可能是引起气道高反应性的因素。

正是由于认识到气道高反应性是哮喘的重要病理生理特征，从而确立了哮喘治疗的原则为抑制气道高反应性产生的一切病理生理基础。因此，深入探讨气道高反应性的机制，有助于更深层次地了解其在哮喘发生发展中的作用，为真正控制哮喘带来新的曙光。

参考文献

de Vries A, Engels F, Henricks PA, et al. 2006. Airway hyper-responsiveness in allergic asthma in guinea-pigs is mediated by nerve growth factor via the induction of substance P: a potential role for trkA. Clin Exp Allergy, 36(9): 1192～1200

Hakonarson H, Maskeri N, Carter C, et al. 1998. Mechanism of rhinovirus-induced changes in airway smooth muscle responsiveness. The Journal of Clinical Investigation, 102(9): 1732～1741

Hunt J, Gaston B. 2000. Airway nitrogen oxide measurements in asthma and other pediatric respiratory diseases. The Journal of Pediatrics, 137(1): 14～20

Ludviksdottir D, Janson C, Bjornsson E, et al. 2000. Different airway responsiveness profiles in atopic asthma, nonatopic asthma, and Sjögren's syndrome. BHR Study Group. Bronchial hyperresponsiveness. Allergy, 55(3): 259～265

Meurs H, Gosens R, Zaagsma J. 2008. Airway hyperresponsiveness in asthma: lessons from in vitro model systems and animal models. Eur Respir J, 32(2): 487～502

Oliver MN, Fabry B, Marinkovic A, et al. 2007. Airway hyperresponsiveness, remodeling, and smooth muscle mass: right answer, wrong reason? American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 37(3): 264～272

Porsbjerg C, Brannan JD, Anderson SD, et al. 2008. Relationship between airway responsiveness to mannitol and to methacholine and markers of airway inflammation, peak flow variability and quality of life in asthma patients. Clin Exp Allergy, 38(1): 43～50

Ramsay CE, Hayden CM, Tiller KJ, et al. 1999. Polymorphisms in the beta2-adrenoreceptor gene are associated with decreased airway responsiveness. Clin Exp Allergy, 29(9): 1195～1203

撰稿人:黄克武

首都医科大学附属北京朝阳医院、北京呼吸疾病研究所

肺动脉高压干预

Intervention of Pulmonary Hypertension

肺动脉高压是以肺小动脉平滑肌收缩或增殖为病理性特征的疾病，表现为进行性肺血管阻力增加，最终导致右心室衰竭，甚至死亡。根据 2008 年 WHO 在美国加州戴纳波恩特（Dana Point）举办的第四次肺动脉高压会议上修订后的分类标准，可分为肺动脉高压、左心疾病相关肺动脉高压、与呼吸系统疾病和缺氧相关的肺动脉高压、慢性血栓栓塞性肺动脉高压、未明确的多因素引起的肺动脉高压。

无论是何种原因引起的肺动脉高压，如果不给予及时治疗，就会导致右心衰竭，甚至危及生命。据统计，肺动脉高压预后不良，其死亡率接近 15%。肺动脉高压病因复杂，发病的相关机制不明确，加之对该病的认识不够，临床一直缺乏有效的、针对性的干预措施。因此，肺动脉高压是如何形成的？是否存在基因突变或所编码的功能蛋白存在缺陷？哪些信号通路参与了肺动脉高压的形成？如何进行物理性干预或药物性干预？由于多种致病途径的存在，包括分子遗传水平、肺动脉平滑肌和内皮细胞病变、肺血管的收缩/舒张因素的失衡、平滑肌细胞的增殖/凋亡失调等，使得预防和治疗肺动脉高压仍然为医学上十分棘手的问题。

1. 对肺动脉高压认识不清成为干预该病的主要阻碍因素之一

（1）由于肺动脉高压症状缺乏特异性，没有理想的诊断手段，又很容易被原发疾病所掩盖，造成漏诊和误诊，其发病率远小于实际发生率，而不受社会关注。

（2）忽视肺动脉高压：除个别以肺动脉高压为主要病理改变的疾病之外，大多数原发疾病中，肺动脉高压仅仅是其继发的病理特征之一，因而医学工作者很容易将治疗和研究的重心集中于原发病而忽视肺动脉高压。

（3）由于肺动脉高压出现于多种疾病当中，致病因素多种多样，其形成机制复杂，干预措施难以做到针对性，治疗效果较差，研究进展慢，被认为是“顽固之疾”，出现消极对待的态度。

（4）目前仍然将钙离子拮抗剂作为治疗肺动脉高压的首选，但是否适用于所有的肺动脉高压的治疗，缺乏科学依据和正确的认识。

（5）对肺动脉高压的干预方面仍旧停留在治表不治根的手段，将肺动脉高压孤立于原发病或其他未知致病因素之外，很容易忽略致病的主要因素。

2. 肺动脉高压是如何形成的，是否存在基因突变和蛋白功能缺陷

国内外对肺动脉高压的形成机制进行了大量的研究，目前认为主要有基因学

说、内皮系统、离子通道和肺血管重建等，其中基因学说是近来最受关注的研究热点，许多研究认为肺动脉高压的发生，与某些基因突变或基因缺失有关，如编码Ⅱ型骨形成蛋白受体（BMPR2）的基因发生突变是肺动脉高压形成的基础，约11%的特发性肺动脉高压（IPAH）存在BMPR2基因突变。Eddahibi等早在1999年研究发现，低氧刺激可显著增加肺动脉平滑肌细胞中5-HT转运体的表达，5-HT转运体基因的缺失对低氧诱导的小鼠低氧性肺动脉高压有明显的保护作用。而在高原性肺动脉高压研究中，发现世居藏族人群该病发生率远小于平原移居者，提示该病的发生可能与遗传因素有关，格日力等近期在《Science》杂志上报道健康藏族人群中被选择的两个基因（EGLN1基因和PPARA基因）多态性与血红蛋白浓度有很强的负相关，表明这两个基因可能是调节在低氧环境下藏族人群无红细胞增多、无肺动脉高压的关键基因。最近也发现激动素受体样激酶-1（ALK-1）基因突变与肺动脉高压相关。但基因学说在肺动脉高压发病机制中所发挥的作用有多大，是否所有肺动脉高压的形成都涉及基因的突变或蛋白的异常表达，仍然不是十分清楚。

3. 哪些信号通路参与了肺动脉高压的形成

参与肺动脉高压的信号通路很多，包括丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）通路、Rho/Rho激酶信号通路、血管紧张素Ⅱ信号通路等，当前研究最多的为Rho/Rho激酶信号通路，其信号通路不仅参与内皮细胞、血管平滑肌细胞等多种细胞分裂增殖，而且与血管平滑肌收缩密切相关，Rho/Rho激酶信号通路异常活化可通过影响一氧化氮（舒张因子）与内皮素1（收缩因子）之间的平衡参与肺动脉高压的发病过程，抑制Rho激酶降低了慢性缺氧鼠远端肺循环血管的新肌化和平滑肌收缩能力。无论何种通路均以通过影响血管收缩和细胞增殖而增加血管阻力，引起肺动脉高压，而信号通路的最终作用点主要有三个。①内皮系统：内皮细胞异常增殖可形成新的血管，可能对肺血管肥厚和结构重塑有促进作用。②离子通道：肺动脉和肺静脉的平滑肌细胞表达不同的K^+通道。K^+通道是血管紧张度的关键调节器，与细胞增殖和凋亡程度、低氧时的多样性反应、病理变化的定位密切相关。肺动脉高压时，电压门控型K^+通道表达减少，胞内K^+和Ca^{2+}增多，从而促进增生。③肺血管重建：在内外致病因子的刺激下，细胞分泌一些因子，如血管内皮生长因子（VEGF）、转化生长因子（TGF-β_1）等，使得细胞增殖/凋亡失平衡，肺小动脉中层肥厚及无平滑肌的细小动脉肌性化。由于肺动脉高压病因复杂，信号通路呈网络型，主要信号通路与次要信号通路不明确，药物的靶治疗效应十分微弱，再加之上述机制并不能全部阐明肺动脉高压的形成，因此揭示肺动脉高压形成机制是药物或其他干预措施有效治疗肺动脉高压的一个至关重要的条件，也是难点之一。而继续研究信号通路，则是解决肺动脉高压的突破点之一。

4. 如何进行有效的干预措施

干预措施无疑要根据肺动脉高压形成的三个主要环节：基因-信号通路-平滑

肌细胞收缩/增殖实施，由于调控肺动脉高压的基因和信号通路至今仍不十分明确，要找到突破口，有一定的难度，但这又是治根的较好途径。因此，加强疾病根源的研究，寻找有效的药物靶点是未来发展的目标。同时也要开展对症治疗的药物开发，如钙拮抗剂、磷酸二酯酶抑制剂、前列环素、吸入型NO、内皮素受体拮抗剂，还有血管紧张素转化酶抑制剂等和中草药制剂，特别是对中草药的开发研究，会产生不可估量的效果。

无论何种干预手段，都是针对肺动脉高压形成的众多机制中的某一环节或某一信号转导途径进行干预，作用效果微弱，达不到从根本上降低的效果。药物治疗更是如此，由于有效成分不清，药物的副作用大，高额药费等也阻碍了对肺动脉高压的治疗。因而，有关对肺动脉高压的干预仍然是任重而道远。

参考文献

崔冰，戴德哉.2004.肺动脉高压药物治疗研究进展.药学进展，28(4)：149～151

孙兴珍，李军，王大为.2005.Rho/Rho激酶信号通路与缺氧性肺动脉高压.国外医学·呼吸系统分册，25(10)：755～758

Achear RO.Yung GL.Saffer H，et al.2006.Morphologic changes in explanted lungs after prostacyclin therapy for pulmonary hypertension.Eur J Med Res，11(5)：203～207

Bonnet S，Archer SL.2007.Potassium channel diversity in the pulmonary arteries and pulmonary veins：Implications for regulation of the pulmonary vasculature in health and during pulmonary hypertension.Pharmacol Ther，115(1)：56～69

Ghofrani HA，Rose F，Schermuly RT，et al.2003.Oral sildenafil as long-term adjunct therapy to inhaled iloprost in severe pulmonary arterial hypertension.J Am Coll Cardiol，42(1)：158～164

Kitaura H，Uozumi N，Yohmi M，et al.2007.Roles of nitric oxide as a vasodilator in neurovascular coup ling ofmouse somatosensory cortex.Neurosci Res，59(2)：160～171

Opitz CF，Ewert R.2006.Dual ET(A)/ET(B) vs selective ET(A) endothelin receptor antagonism in patients with pulmonary hypertension.Eur J Clin Invest，36(Supp 13)：1～9

Simonson TS，Yang YZ，Huff1 CD，et al.2010.Genetic evidence for high-altitude adaptation in Tibet.Science，329(5987)：72～75

Teichert-Kuliszewska K，Kutryk MJ，Kuliszewski MA，et al.2006.Bone morphogenetic protein receptor-2 signaling promotes pulmonary arterial endothelial cell survival：implications for loss-of-function mutations in the pathogenesis of pulmonary hypertension.Circ Res，98(2)：209～217

Vallerie VM，Stephen LA，David BB，et al.2009.ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension.J Am Coll Cardiol，53：1573～1619

撰稿人：格日力 靳国恩
青海大学

小气道阻塞性改变的定义及诊断

Definition and Diagnosis of Small Airway Obstruction

小气道阻塞性病变是呼吸系统常见病变，是许多呼吸道疾病如COPD、哮喘或吸烟等所致气道阻塞的早期表现，其病变部分是可逆的。早期诊断、及时预防和治疗小气道病变对预防发展为不可逆性病理改变有重要的意义。但是因其发病机制不清楚，定义不明确，命名杂乱重叠，病理学分型及临床特征复杂多样、无特异性，组织病理类型与临床和影像之间缺乏明确的关联，缺乏早期实验室和辅助诊断方法等使临床诊断非常困难，致使小气道阻塞性病变误诊和漏诊率非常高，延误了治疗。因此，探明小气道阻塞性病变发病机制，明确定义和建立敏感性高、特异性强的诊断方法是早期诊断小气道阻塞性病变的关键难题。

难题之一：小气道阻塞性病变的定义不清

小气道阻塞性病变是一种非特异性的描述性名称，主要累及内径小于2mm的气道，包括细支气管、终末细支气管及呼吸性细支气管等，以阻塞性病变为特征，故称小气道阻塞性病变。通常疾病分类主要是根据组织病理学分型或病因学。由于小气道阻塞性病变发病机制不清，组织病理学分型及临床特征复杂多样，导致疾病定义不清或命名范畴重叠。10年前，Wright及其同事提出了关于“小气道疾病”的权威性综述，其中包括了吸烟、矿物粉尘、移植性细支气管炎、闭塞性细支气管炎及细支气管炎伴机化性肺炎（bronchiolitis obliterans organizing pneumonia，BOOP）。Hwang等将小气道疾病分为：①感染性细支气管炎；②缩窄性细支气管炎；③增殖性细支气管炎（包括BOPP）；④呼吸性细支气管炎；⑤弥漫性全细支气管炎；⑥矿尘诱发的细支气管炎。而Wrothy和GH-Muller则根据临床及影像学表现提出下列5种组织病理学类型：①细胞性细支气管炎；②全细支气管炎；③呼吸性细支气管炎；④缩窄性细支气管炎；⑤闭塞性细支气管炎伴腔内息肉。这些分类比较混乱。因此，Ryu提出一个框架，将小气道阻塞性病变分为：①原发性小气道病变；②肺实质疾病中小气道显著受累；③大气道疾病中小气道明显受累。原发性小气道疾病包括闭塞性细支气管炎、急性细支气管炎、弥漫性泛细支气管炎、呼吸性细支气管炎、矿物粉尘气道疾病、滤泡性细支气管炎及其他极少见的类型。在数种间质性肺病中，小气道亦可受累，包括过敏性细支气管炎、呼吸性细支气管相关的间质性肺病、隐源性机化性肺炎（特发性闭塞性细支气管炎伴机化性肺炎）、肺朗汉斯巨细胞性组织细

胞增多症等。大气道疾病中最常累及小气道的有支气管扩张、慢性阻塞性肺疾病、囊性纤维化等疾病。虽然临床医生、病理学家和放射学家等从各自的视角进行了不同的分类，至今尚无一个被人们广泛接受。因此，探明小气道阻塞性病变发病机制、明确定义、准确分类是小气道阻塞性的主要难点。

目前认为，通过确定基本的组织病理学类型和评价相关的临床-生理学-放射学关系是确定小气道损伤临床意义最合理的方式。

难题之二：小气道阻塞性病变诊断困难

小气道的解剖特点为管腔纤细、管壁菲薄、纤毛上皮细胞减少、平滑肌和分泌细胞增多、总横截面积大、网状结构形成。由于上述解剖特点，在炎症或烟尘刺激后可发生小气道病变，包括管腔阻塞、黏膜溃疡、炎性细胞浸润、杯状细胞增多、平滑肌肥厚和结缔组织增生等改变。小气道虽然数量巨大，但在气道阻力中只占20%左右的比例，即使小气道阻力增加数倍，常规肺功能检查亦不易发现，只有破坏严重时才有明显症状及肺功能异常，某些患者的小气道功能变化即使通过病理学观察也不能得到完满解释。小气道阻塞性病变早期无症状和体征，晚期缺乏特征性临床表现。组织病理类型与临床和影像之间缺乏明确的关联，即便存在明确关联者，可能因为有限的病理改变难以解释其影像和不能引起需要临床诊断的症状及功能减退。此外，小气道病变容易与肺实质病变及支气管混淆。再者小气道阻塞性病变无论从临床、影像和病理学均表现得十分复杂、多变。缺乏特异性和敏感性强的诊断方法等因素致使临床诊断非常困难。

目前小气道阻塞性病变的确诊需要开胸行肺活检，难度很大。辅助检查手段很有限，比较常用的有肺功能测定和高分辨率电子计算机断层扫描（HRCT）。

肺功能中，测定小气道功能的指标最初用闭合气量测定法、频率依赖性顺应性测定方法，后来采用最大呼气中期流量测定法，用力呼气中后期瞬间流量测定法等。前两项指标因其测定需特殊设备、测试复杂、重复测定变异较大、敏感性不高，目前已较少采用。后两者是目前最常用的小气道功能测定。但是研究发现，小气道病变组与$FEF_{50\%}$及$FEF_{75\%}$最具相关性的病理改变为结缔组织增生与平滑肌肥厚，提示最大呼气中期流量反映的是小气道晚期病变。

HRCT是目前公认的评价小气道疾病的影像学方法。正常情况下，细支气管因管壁厚度（<0.1mm）低于HRCT的分辨率而不显影，当发生细支气管炎症，出现细支气管管壁增厚、细支气管扩张、气管管腔嵌塞时，受累气道在肺外周易于鉴别。但是，如果病灶的大小低于HRCT可见的肺结构的下限，或细支气管区域不存在形态学改变，则很难发现这些细支气管病灶。HRCT影像表现依据细支气管病变类型不同而有差异。此外，HRCT扫描虽有些特征性表现，但无特异性，且设备昂贵，使用范围局限。因此，深入研究小气道阻塞性病变机制，明确定义，制定小气道阻塞性病变的防治指南和开发一套敏感性高、特异性

强、简单易行的无创性检测方法是解决小气道阻塞性病变临床诊断困难的关键。近年来，在医学科学工作者的努力下，小气道阻塞性病变的基础研究取得了重大的突破，医疗技术进展迅速，医务人员对小气道阻塞性病变的认识显著提高。我们相信，破解小气道阻塞性病变难题为时不远。

参考文献

Cordeiro CR. 2006. Airway involvement in interstitial lung disease. Curr Opin Pulm Med, 12(5):337～341

Hogg JC, Chu F. 2006. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J, 27:250～252

Markopoulo KD, Cool CD, Elliott TL, et al. 2002. Obliterative bronchiolitis; varying presentations and clinic pathological correlation. Eur Respir J, 19:20～30

Ooi GC, Khong PL, Chan-Yeung M, et al. 2002. High-resolution CT quantification of bronchiectasis: clinical and functional correlation. Radiology, 225(3):375～379

Visscher DW, Myers JL. 2006. Bronchiolitis: the pathologist's perspective. Proc Am Thorac Soc, 3(1):41～47

Worthy SA, Muller NL. 1998. Small airway diseases. Radiol Clin North Am, 36(1):163～173

撰稿人：格日力[1]　高　芬[2]

1 青海大学

2 青海大学附属医院

寻找胰腺癌的早期诊断标志物

The Screening of Biomarkers for the Early Diagnosis of Pancreatic Carcinoma

胰腺癌是常见的恶性肿瘤之一，其发病率呈逐年增高趋势。在欧美国家中，胰腺癌的发病率每年为（9～10）/10 万；据国内上海市资料统计表明，1990 年发病率已达到 5.1/10 万，近 20 年发病率增加了 4 倍。而且胰腺癌的恶性程度很高，我国胰腺癌死亡率已由癌症死亡率的第 16 位上升到第 6 位（世界上为第 4 位），在确诊后只有 12% ～15% 的病例可进行手术根治，5 年生存率低于 5% ，90% 以上的患者在确诊后 1 年内死亡，即使经过化疗、内照射等治疗，中位生存期仍徘徊于 6～10 个月。尽管手术切除仍是目前唯一有效的胰腺癌治疗方法，但超过半数患者在确诊时已经局部或远处转移。目前尚缺乏胰腺癌早期诊断的特异性血清标志物，如能在该方向上取得突破，有望将胰腺癌的早期诊断率由目前的 10% ～20% 提高到 40% 左右，将极大改善胰腺癌的生存期。

国内外学者已从肿瘤相关蛋白、基因突变、表观遗传学、非编码 RNA 等方向入手，目前已经发现了一系列胰腺癌相关的血液标志物，如 K-ras 突变、p16 基因甲基化异常、miR-21 和 miR155、CEACAM1 和 MIC1 蛋白标志物等，但上述指标与临床应用的 CA19-9 相比，敏感性和特异性没有显著优势，尤其是无法准确将胰腺癌和慢性胰腺炎有效区分。因此，胰腺癌特异性标志物的寻找一直是国内外科学家面临的难题，被公认为“21 世纪医学亟待攻克的难题”之一。目前发现的一系列潜在的标志物如表 1 所示。

表 1　目前发现的胰腺癌特异性候选标志物

蛋白标志物	DNA 及其甲基化标志物	miRNA 标志物
CA19-9	K-ras	miR-21
CEA	C-myc	miR-221
MUC1	p53	miR-181a，b
CEACAM1	p16	miR-155
MIC1	cyclin D2	miR-222
TIMP-1	FOXE1	miR-107
Osteo-prontin	NPTX2	miR-196a
PAP	ppENK	miR-148a

续表

蛋白标志物	DNA 及其甲基化标志物	miRNA 标志物
……	TFPI2	miR-375
	S100A4	……
	DPC4	
	……	

血清 CA19-9 糖抗原是目前唯一被用于临床的胰腺癌标志物，以通常放射免疫测定参考值 37 U/ml 为界限，具有一定的筛查效率，但发现的胰腺癌多为中晚期，在临床上主要辅助用于：①判断胰腺癌手术切除的可能性；②判断手术的切除效率及术后复发；③判断胰腺癌分期。因其在 Lewis 血型抗原阴性者中不表达，而且部分胆汁淤积者和慢性胰腺炎者中也会升高，总体敏感性为 50%～70%，特异性为 45%～65%。所以，目前认为单独血清 CA19-9 检测不适宜用于早期胰腺癌尤其是小胰癌的监控和慢性胰腺炎与胰腺癌的鉴别诊断。除 CA19-9 之外，黏蛋白家族 MUC1、CEACAM1（CEA 相关细胞黏附分子）和 MIC1（巨噬细胞抑制因子）等分子标志物也显示了部分检测价值，例如 MUC1 区分胰腺癌和正常组织的敏感性（90%）优于 CA19-9，但对区分胰腺癌和慢性胰腺炎的特异性（44%）低于 CA19-9，CEACAM1 和 MIC1 的检测结果同 MUC1 类似。正是由于单一抗原的检测效果不理想，有学者联合了 MIC-1、CA19-9、TIMP-1、Osteo-prontin、PAP 等多种抗原，但发现检测效果与单独的 CA19-9 相比并不具有显著优势。

希望在今后的 10～20 年内，通过血清多肽芯片技术、miRNA 微阵列或其他先进技术手段，筛选并确认胰腺癌相关的血液标志物，诊断胰腺癌的敏感性达到 90% 以上，特异性超过 85%，尤其是在胰腺癌早期（肿瘤直径小于 1cm 或影像学阴性，无远处转移）即有异常，可与 AFP 对肝癌和 PSA 对前列腺癌的诊断价值相媲美。寻找对早期胰腺癌有足够敏感性和特异性的肿瘤标志物，理想的血清标志物应具有下述三个特征：①是一种分泌蛋白或核酸产物；②只在胰腺癌而不是其他情况中高表达；③在人体其他组织和器官中表达很少。值得注意的是，蛋白质组学在胰腺癌血清标志物筛选方面已经显示了一定优势，近年来，随着分子生物学技术的发展，人体液体标本中肿瘤细胞释放的游离 DNA 或 RNA 成为新的研究靶点，一些新的基因检测方法的成熟也显现出其诊断应用前景。2008 年，有学者总结了当时已经发现的可能与各种消化道肿瘤（包括胰腺癌）发生和预后相关的 miRNA，分别有 7 种及 2 种 miRNA 在胰腺癌中呈高表达及低表达，而到了 2010 年，共发现有 25 种和 18 种 miRNA 在胰腺癌中呈高表达及低表达，表明胰腺癌相关的 miRNA 研究进展十分迅速，今后将会有更多、特异性更强的胰腺癌相关 miRNA 被发现。

目前寻找胰腺癌早期诊断标志物的主要困难在于，缺乏真正意义上的“早期”胰腺癌的临床组织样本，因大部分患者就诊时已是晚期，难以对大规模人群开展前瞻性研究。而按照胰腺癌经典的成瘤假说（图1），胰腺上皮内瘤变（PanIN）可能是胰腺癌早期诊断的靶点。PanIN是指在胰腺导管内出现微灶性、乳头或扁平性、非浸润性上皮细胞瘤样生长，这种生长具有渐进性特点，伴随不同程度的黏蛋白产生和组织/细胞结构的异常，可以分为三期，属于胰腺癌的癌前病变，在各期中均有不同基因的突变。在PanIN由癌前病变向浸润性癌进展过程中存在累积性的病理形态变化，同时伴随特异性细胞遗传学的改变（包括经典遗传学和表观遗传学）。在经典遗传学方面，K-ras突变发生于早期，并持续存在，而p53突变发生于晚期。PanIN的组织标本在临床上很难获得，因此有学者成功构建了转基因小鼠等模型，尽管可以在短期内人为制造出PanIN的效果，但是是否可以此为基础筛选出与人类同源的标志物尚有待验证。

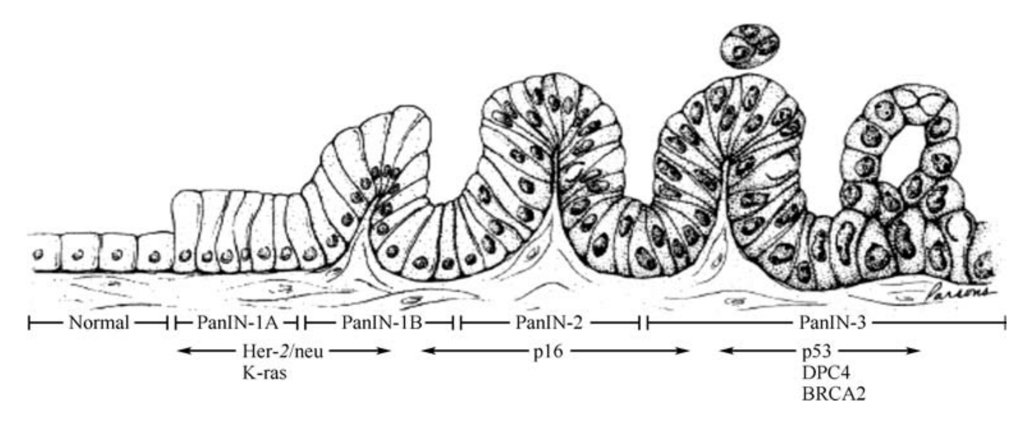


图1　胰腺癌上皮内瘤变（PanIN）模式

引自 Hruban RH, et al. 2000. Am J Pathol

参考文献

Gold DV, Modrak DE, Ying Z, et al. 2006. New MUC1 serum immunoassay marker differentiates pancreatic cancer from pancreatitis. J Clin Oncol, 24(4): 252～258

Grote T, Logsdon CD. 2007. Progress on molecular markers of pancreatic cancer. Curr Opin Gastroenterol, 23(2): 508～514

Hruban RH, Wilentz RE, Kern SE. 2000. Genetic progression in the pancreatic ducts. Am J Pathol, 156(6): 1821～1825

Ji B, Tsou L, Wang H, et al. 2009. Ras activity levels control the development of pancreatic diseases. Gastroenterology, 137(3): 1072～1082

Koopmann J, Rosenzweig CN, Zhang Z, et al. 2006. Serum markers in patients with resectable

pancreatic adenocarcinoma：macrophage inhibitory cytokine 1 versus CA19-9. Clin Cancer Res, 12(6):442～446

Okusaka T, Yamada T, Maekawa M. 2006. Serum tumor markers for pancreatic cancer：the dawn of new era? J Pancreas, 7(5):332～336

Rachagani S, Kumar S, Batra SK. 2010. MicroRNA in pancreatic cancer：pathological, diagnostic and therapeutic implications. Cancer Lett, 292(1):8～16

Simeone DM, Ji B, Banerjee M, et al. 2007. CEACAM1, a novel serum biomarker for pancreatic cancer. Pancreas, 34(6):436～443

Visone R, Petrocca F, Croce CM. 2008. Micro-RNAs in gastrointestinal and liver disease. Gastroenterology, 135(6):1866～1869

撰稿人：李兆申　杜奕奇
第二军医大学附属长海医院

重症急性胰腺炎的发病机制及综合救治模式探索

Study on the Mechanism of Severe Acute Pancreatitis and Its Treatment Protocol

重症急性胰腺炎（severe acute pancreatitis，SAP）属于临床常见急症，占急性胰腺炎的15%～20%，病情危重，预后凶险。近年来资料显示发病率有增高趋势，病死率仍居高不下，文献报道年发病率50/10万，病死率高达15%～30%。据国内统计，大型专科化医院的平均死亡率为17.1%，国外平均为17.2%。尽管近50年来SAP治疗的方向逐渐由早期手术治疗向延期、选择性的手术治疗转变，也有生长抑素、早期肠内营养（EN）、连续性血液净化等措施的出现，在一定程度上提高了SAP的救治成功率，但是因为SAP的发病机制尚未完全阐明，包括全身炎症反应综合征、腹腔间室综合征等引起的一系列病理生理变化，导致目前SAP的救治陷入“瓶颈”。SAP病情凶险、病程冗长，阻断病变的发展，预防继发性感染，控制器官的损害与并发症的发生是治疗的重点。因此，探索重症急性胰腺炎的综合救治模式，提出科学、可行的诊治方案，以图规范SAP的救治，提高救治水平，节约卫生资源意义重大。

国内外已经相继出台了很多SAP的指南和共识，但这些指南的可操作性仍存在较大困难，各个指南相互之间仍存在一定的分歧，导致目前SAP救治尚无统一的模式，有些医院以外科为主，有些医院以内科为主，有些医院以中西医结合为主，救治水平差异很大。同时，因为我国的SAP病因仍以胆道因素为主，不同于西方国家的酒精性胰腺炎，因此在病程和预后方面也有差异。目前尚有下列问题需要解决或存在争论：

1. 肠内营养的时机问题

目前倾向于早期肠内营养，肠内营养的优点在于改善门静脉系统循环、恢复肠功能、维护肠屏障、有利于蛋白质合成。但究竟SAP发生后多早给予肠内营养仍有争论，一般认为肠道功能开始恢复，就应及时给予肠内营养，可在48～72小时内。一项最新的荟萃分析认为，只有24或48小时内的肠内营养，与后期肠内营养和静脉内营养（PN）相比，才有降低SAP感染率和死亡率的优势。目前的困难是多项研究之间缺乏可比性，如分别采用鼻胃管或鼻空肠管、不同的营养配伍，相关研究若要得出明确结论，必须在试验设计上更为严谨。近期美国NIH正在开展一项比较鼻胃管和鼻空肠管肠内营养治疗SAP的多中心临床研

究，希望能够为上述问题的解决提供一个思路。

2. 早期液体复苏问题

几乎所有指南均提到早期液体复苏以补充血容量的问题，但是目前的依据均来自于动物或非对照的病例研究，尚未在最佳的血容量监测方法（胸内血流指数或中心静脉压）、合适的液体种类（晶体或胶体）、合适的补液量、补液时机等环节上形成统一的认识。这一难题的解决需要更多的临床对照研究来完成。

3. 外科手术的时机问题

因为SAP胰腺坏死感染后，患者全身情况迅速恶化，手术并发症和死亡率增加，胰腺坏死组织的清除应尽可能在感染发生前或即将发生时进行。但也有人认为坏死感染不是手术的严格指征，保守治疗尽管可使一小部分患者避免手术，但对多数患者将延误手术时机，具有很大的风险。

4. 抗生素的使用问题

强烈怀疑坏死感染时，或已明确感染时，在经皮或手术引流的基础上应用抗生素。感染明确时抗生素经验用药首选碳青霉烯类或碳青霉烯类+万古霉素。预防性抗生素在无感染的坏死性SAP是否值得应用仍有争议，多数认为应使用，但近期荟萃分析的结果表明，预防性使用抗生素将无助于降低SAP的死亡率。对SAP患者长时间、大剂量地应用广谱抗生素，不但不能有效预防感染，相反会增加继发感染和机会感染的发生率。抗生素的使用体现出临床经验和循证医学不统一的问题，需要今后更多可靠的临床对照研究加以证实。

5. 腹腔间室综合征（ACS）的发病机制

SAP并发ACS的发病机制未完全明确，可能与直接压迫、血管渗漏、缺血再灌注损伤、血管活性物质释放及氧自由基等综合作用，导致脏器水肿、细胞外液大量增加有关。但什么样的SAP才会发生ACS？与本身SAP的全身损害释放入血的炎性因子有关还是和SAP局部的腹腔损害有关？SAP需要大量液体复苏的情况下，如何通过适度的补液来预防或减轻ACS？ACS和胃肠麻痹有何关系？ACS可造成肾功能损害的机制仍不清楚，有学者观察到许多患者在腹内压力升高之前肾功能已经发生了损害。因此，SAP合并ACS还有很多病理生理机制需要阐明。

6. 全身性炎症反应（SIRS）的发生和阻断机制

阻断SIRS可降低SAP的严重程度，连续性血液净化（CBP）可通过清除SIRS患者炎症介质以减轻炎症反应，清除胰源性毒素，纠正体内酸碱紊乱，改善单核细胞抗原提呈能力，重建机体免疫系统内环境稳态，超滤减轻组织间隙水肿，发挥腹腔减压作用，但CBP的指征和持续时间目前尚不统一。

SAP是目前公认的医学难题之一。希望在今后的10～20年内，通过临床专家的多学科协作，实施多中心的设计良好的临床试验，评价各种临床救治措施的

方法和效果，最终提出科学、可行的综合救治模式和诊治方案，以达到消除地区间、医院间、科室间、医生间救治水平的差异，并提高疗效、降低医疗负担的目的。

SAP属于临床危重病学范畴，没有危重病学相关的专业知识和实践能力，无法真正理解SAP的病理生理机制，更难以实施准确、恰当和及时的治疗，更无法提出既具有可操作性强、又科学合理的急性胰腺炎诊治指南和规范。同时，SAP的救治涉及多个学科，需要多学科积极协作，才能真正高水平地实施SAP的救治。

参考文献

Bai Y, Gao J, Zou DW, et al. 2008. Prophylactic antibiotics cannot reduce infected pancreatic necrosis and mortality in acute necrotizing pancreatitis: evidence from a meta-analysis of randomized controlled trials. Am J Gastroenterol, 103: 104～110

DiMagno MJ, DiMagno EP. 2007. New advances in acute pancreatitis. Curr Opin Gastroenterol, 23: 494～501

Dimagno MJ, Wamsteker EJ, Debenedet AT. 2009. Advances in managing acute pancreatitis. Med Rep, 1: 59

Kylänpää ML, Repo H, Puolakkainen PA. 2010. Inflammation and immunosuppression in severe acute pancreatitis. World J Gastroenterol, 16(23): 2867～2872

Petrov MS, Pylypchuk RD, Uchugina AF. 2009. A systematic review on the timing of artificial nutrition in acute pancreatitis. Br J Nutr, 101: 787～793

撰稿人：李兆申　湛先保
第二军医大学附属长海医院

炎症性肠病的发病机制和生物治疗的研究

Mechanisms and Biotherapy of Inflammatory Bowel Disease

炎症性肠病（IBD）包括溃疡性结肠炎（ulcerative colitis，UC）和克罗恩病（Crohn's disease，CD）。IBD 的发病机制未明，至今仍是医学界的难题之一。随着分子生物学、分子遗传学和现代免疫学的发展，研究发现 IBD 的发病机制涉及遗传、微生物、黏膜屏障、内环境、免疫反应异常等多个方面。

IBD 的家族聚集性最早是在 20 世纪 30 年代被报道的，阳性家族史是 IBD 最大的独立危险因素。证明遗传因素与 IBD 有关的最有力的证据是，单卵双生子同患 CD 或 UC 的一致性高达 37.3% 和 10%，双卵双生子则分别为 7% 和 3%。自 2001 年发现 CD 第一个易感基因 ARD15/NOD2 后，一系列 CD 易感基因位点相继被证实，如 IBD1-9、白细胞介素-23 受体（IL-23R）、ATG16L1、PTPN2 等。学者们对 IBD 基因型与临床表型之间的相互关系进行了深入探讨，但 ARD15/NOD2 基因突变与 IBD 发病的确切关系仍尚未阐明。

大量研究证明，微生物特别是共生菌群与宿主防御反应之间的动态平衡在慢性 IBD 的初期和进程中起关键作用。细菌入侵结肠黏膜可能与天然免疫应答缺陷，如 CARD15/NOD2 和 NF-κB 蛋白突变和缺陷有关；另一方面，黏膜对损伤的保护机制缺陷也可能参与了 IBD 发病。天然免疫的效应分子，如黏液素、三叶草肽和防御素等均可能介导了直接的黏膜保护反应，这些分子的异常可能会引起黏膜保护机制的破坏。研究发现，肠道细菌参与 IBD 发病的可能机制包括：肠道菌群失调，触发 IBD 发病；肠黏膜屏障功能缺陷，肠道通透性增高，肠腔内成分诱发异常免疫反应；肠道免疫功能异常，对肠道内物质失去耐受；肠道内某些过度生长的细菌能影响肠上皮细胞能量代谢，导致上皮细胞受损伤，诱发肠道炎症的发生。但问题的关键是，与 IBD 发病相关的细菌是什么？是否存在特异性的细菌？

有关 NOD2 的研究显示，巨噬细胞和上皮细胞的激活启动了免疫反应，而 T 细胞活化则使炎症反应放大和慢性化。IBD 患者黏膜固有层的免疫细胞对刺激可做出特异性反应，以 Th1 细胞为主的黏膜免疫应答发展为 CD，释放 IFN-γ、TNF-α，IL-12 增加，IL-4 减少；以 Th2 细胞为主的黏膜免疫应答则在 UC 中占优势，IL-5、IL-13 增加，但 IL-4 不增加；IL-17 的表达在 Th1 型应答和 Th2 型应答中均上调。因此，Th1/Th2 失衡在 IBD 的发病中具有重要意义，CD 和 UC

有着不同的免疫反应类型。Th1/Th2 平衡受细胞因子调节，IL-12、IFN-γ、IL-4 和 IL-10 是参与其调节的重要因子。细胞因子失调可由 Th1/Th2 紊乱引起，并反馈性地加重 Th1/Th2 失衡，形成恶性循环。最近研究发现在 IBD 的两种主要免疫应答类型之间还存在着一种更为复杂和重要的重叠——Th17 型免疫应答，Th17 由 IL-17 的产物识别，该型免疫应答由 IL-23 促发，可被 Th1 和 Th2 型转录因子抑制。IL-23 在体内维持 Th17 型应答的机制尚不清楚，但有研究提示前体细胞向 Th17 亚型分化是受转化生长因子 TGF-β 驱动的，而 IL-23 可扩增和维持 Th17 细胞数。此外，IL-2 信号系统可通过信号转导和转录活化因子（STAT）5 抑制 Th17 细胞产生，而 Th17 细胞通过调节性 T 细胞（Treg 细胞）促使炎症反应发生。虽然有关 IBD 的免疫反应的研究进展很快，但是其具体调控网络还不明确。

免疫学及分子生物学治疗 IBD 是近年的研究热点。细胞因子用于治疗 IBD 主要包括应用促炎症性细胞因子单抗、抗炎症性细胞因子两个方面。在 IBD 病理过程中重要的促炎细胞因子有 IL-1、IL-2、IL-6、IL-8、IL-γ、IL-α 等，其中研究较多的是 TNF-α。TNF 单克隆抗体如 infliximab 的临床研究显示了较好的效果，能改善 IBD 的活动度，促进黏膜溃疡和瘘管的愈合。重要的抗炎因子有 IL-4、IL-10、IL-13 等，其中研究较多的是 IL-10，治疗后患者的排便频率减少，内镜下肠黏膜的形态改善，治疗反应较好且具有良好的耐受性；Kucharzik 研究了 3 种抗炎因子联用与单用的效果，发现 IL-10 与 IL-4 及 IL-10 与 IL-13 联用，对已激活的中性粒细胞炎性反应的下调作用比单用更好。但是，炎症因子在 IBD 的发病机制链中处于下游，针对单一或多个细胞因子的治疗方法存在很大的局限性，报道的临床效果也相差较大。

因此，学者开始研究发病机制链的上游。利用造血干细胞移植（hematopoietic stem cell transplant，HSCT）重建人体免疫系统功能成为研究方向，国内外都有成功的相关报道。虽然 HSCT 也存在一些并发症如感染、移植物抗宿主病、重要脏器损伤等，但 HSCT 不可避免地将成为治疗 IBD 的重要方法。但是，HSCT 是否能真正解决 IBD 的治疗难题还是个未知数，因为病例数太少，有待临床研究者继续探索。

参考文献

Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. 2007. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. Nat Immunol, 8(4): 345～350

Craig RM, Traynor A, Oyama Y, et al. 2003. Hematopoietic stem cell transplantation for severe Crohn's disease. Bone Marrow Transplant, 32(Suppl 1): S57～S59

Cunliffe RN. 2003. Alpha-defensins in the gastrointestinal tract. Mol Immunol, 40: 463～467

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. 2001. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature, 411: 599～603

Kastelein RA, Hunter CA, Cua DJ. 2007. Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. Annu Rev Immunol, 25: 221～242

Laurence A, Tato CM, Davidson TS, et al. 2007. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. Immunity, 26(3): 371～381

Maeda S, Hsu LC, Liu H, et al. 2005. Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. Science, 307(5710): 734～738

Orholm M, Binder V, Sirensen TI, et al. 2000. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins: results of a nationwide study. Scand J Gastroenterol, 35 (10): 1075～1081

Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, et al. 2007. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. Annu Rev Immunol, 25: 821～852

Xavier RJ, Podolsky DK, 2007. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Nature, 448(7152): 427～434

撰稿人:厉有名

浙江大学医学院附属第一医院

肾脏纤维化——有待攻克的肾脏病学难题

Renal Fibrosis：The Challenge and Opportunity for Nephrology

肾脏纤维化是导致慢性肾功能衰竭的关键原因，阐明肾脏纤维化发生机制将为慢性肾功能衰竭早期防治提供新思路。肾脏纤维化研究中的关键难题是：肾脏炎症反应是如何形成的？炎症细胞和肾脏固有细胞是如何相互作用的？炎症介质调控肾脏固有细胞表型改变的分子机制是什么？我们可否建立起无创性动态监测预测肾脏纤维化形成的指标？固有细胞表型改变是否可以逆转？科学回答这些问题，将为人类彻底攻克肾脏纤维化打下坚实基础。

肾脏纤维化（renal fibrosis）是慢性肾脏病（chronic kidney disease，CKD）发展为慢性肾衰竭的关键原因，其病理特征为肾单位结构毁损，肾脏固有细胞消失，细胞外基质成分堆积。据国际肾病学会估计，全球成人CKD患病率高达10%，其中不少患者将不可避免地因肾脏纤维化而发展为慢性肾功能衰竭。慢性肾功能衰竭患者必须依赖肾脏替代治疗维持生命，我国目前接受肾脏替代治疗的患者人数正以每年11%的速度增长，医疗费用巨大。攻克肾脏纤维化成为慢性肾功能衰竭防治中最为关键的科学问题。

人类对肾脏纤维化认识已经数百年。早在欧洲文艺复兴时期，意大利解剖学家米开朗基罗就发现肾脏发生萎缩。1827年，英国医生Richard Bright首先发现肾炎能够引起肾脏萎缩。1952年，Robert Platt提出肾脏结构改变最终可能引起肾功能衰竭。1955年，Poul Iversen和Claus Bruns首次将肾脏活组织检查应用于肾脏病诊断。目前人们已经认识到肾脏纤维化是肾脏慢性炎症瘢痕修复的灾难性结局。因此，攻克肾脏纤维化，必须要搞清楚肾脏炎症反应是如何启动的，炎症反应启动后肾脏固有细胞发生了哪些反应，这些反应如何才能被临床监测和控制等一系列科学难题。

1. 肾脏的炎症反应是如何启动的

肾脏炎症反应是肾脏纤维化形成的始动因素。研究证实，包括创伤、感染、免疫反应、血流动力学改变、代谢紊乱、遗传性疾病在内的多种病因均可诱导肾脏发生炎症反应。现在认为，肾小球毛细血管内皮细胞最易遭受各种损害性因素的刺激，内皮细胞损伤是激发肾脏炎症反应形成的重要原因。内皮受损后，一方面会引起血小板聚集、促凝血物质释放，局部微血栓形成；另一方面，促炎物质释放，炎症细胞浸润、黏附，释放炎症介质（包括生长因子、趋化因子、肿瘤坏

死因子等）。而炎症介质对肾脏固有细胞（如上皮细胞、足细胞、内皮细胞和肾小管上皮细胞等）和炎症细胞的交互作用起着十分重要的沟通、联络和激化作用。它们刺激系膜细胞增殖肥大和激活，细胞外基质产生过多，导致足细胞表型改变，促进与肾小球壁层上皮细胞形成球囊粘连，引起肾小球硬化形成。可见，阐明肾脏炎症反应启动和持续的分子机制是肾脏纤维化研究中需要首先解决的难题。

2. 肾脏固有细胞在纤维化发生过程中的生物学作用是如何调控的

肾脏固有细胞是构成正常肾脏结构的基础，在纤维化形成过程中，它们不仅是被动受害者，还是主动参与者。炎症介质通过介导肾脏固有细胞发生表型转化，即细胞逐渐丧失自身的表型特征，获得间充质细胞表型，而分泌大量细胞外基质。细胞外基质成分积聚后又反过来促进固有细胞凋亡，肾单位结构毁损，最终遗留大量瘢痕组织。显然，阐明炎症介质调控固有细胞行为的分子机制是我们揭开肾脏纤维化神秘面纱的突破口。最近大量研究发现，多条分子信号径路可能调控肾脏纤维化形成过程中固有细胞的行为。例如转化生长因子-β（TGF-β）作用于细胞后可触发 Smad、p38 MAPK、JNK 和 Rho 等多条信号转导通路，调节核转录因子（NF-κB、Snail、Twist 等）的分布和水平，从而使细胞正常生物学行为发生转变，如诱导系膜细胞增殖肥大、足细胞损伤、小管上皮细胞间充质转化（epithelial-to-mesenchynal transition，EMT），不断合成细胞外基质成分。但是，不同炎症介质它们作用的信号通路不同，它们是如何殊途同归、最后协调有序地促进纤维化形成，仍然是人们百思不得其解的难题。

3. 人类有无可能逆转肾脏炎症修复过程中纤维化的结局

人体修复炎症损伤主要有两种形式：一是由损伤周围的同种细胞来修复，部分或完全恢复原组织的形态及功能；二是由纤维结缔组织来修复，它无法恢复原有组织的结构和功能。有趣的是，大多数急性肾炎和单纯性急性肾小管坏死均以第一种方式修复，而慢性肾脏病则以纤维化方式来修复。肾脏纤维化不可避免地破坏肾单位，最终造成慢性肾功能衰竭。因此，如何促使肾脏无瘢痕修复是科学家们需要努力攻克的难题。最近，科学家们在实验中发现肾小管上皮细胞发生 EMT 后可以逆转，骨髓间充质干细胞可以向肾脏固有细胞转化，促进损伤的固有细胞修复，这些研究结果向人们展示了肾脏纤维化治疗的美好前景，值得我们进一步去探索。

4. 肾脏纤维化形成过程可否进行无创性动态监测

由于肾脏纤维化发生过程悄无声息，患者不知不觉，此为早期防治慢性肾衰竭带来很大困难。过去 50 多年来，肾活检已成为肾脏纤维化诊断最可靠的手段，但作为一种创伤性检查，其临床应用受到限制。随着检测技术的进步，人们发现，尿液中可以检测到多种炎症介质和肾脏固有细胞标志物，且它们和肾脏纤维

化程度密切关联。因此，对尿液中炎症介质、足细胞、上皮细胞或间充质细胞生物标志物的检测有可能为临床预测肾脏纤维化提供新颖的手段。目前这一领域的研究方兴未艾。人们有理由相信，各种先进的检测技术和循证医学方法将使人们最终找到敏感、特异、无创的新型肾脏纤维化诊断方法。

5. 如何开发有效的肾脏纤维化靶向性治疗药物

对肾脏纤维化过程中固有细胞行为改变及其关键分子调控机制的认识，也有可能为寻找肾脏纤维化的防治靶点提供新思路和新策略。1985 年，Anderson 和 Brenner 首次发现血管紧张素Ⅱ（angiotensin Ⅱ，AngⅡ）通过肾小球内高压力而促进肾小球硬化后，即将 AngⅡ转换酶抑制剂（ACEⅠ）和 AngⅡ受体拮抗剂（ARB）成功应用于慢性肾脏病的治疗。现已证实，早期合理使用 ACEⅠ或 ARB 治疗可有效降低血压和蛋白尿，抑制肾脏纤维化。但是这类药物似乎并不能完全阻断肾脏纤维化的发展。2003 年，哈佛大学 Zeisberg 等证实骨形态发生蛋白-7（BMP-7）能够拮抗 TGF-β_1 诱导的上皮细胞间充质转化，并逆转肾脏纤维化，这一发现为人们逆转纤维化打开了一扇窗。不过，抗肾纤维化药物的开发，可谓是前途光明、道路曲折，需要找准靶点，需要基础科学家、生物工程人员、药物学家和临床专家的共同努力。

总之，尽管人类在攻克肾脏纤维化的道路上仍步履维艰，但在历经数十年辛勤探索后，我们已经从细胞和分子水平上初步描绘出了肾脏纤维化发生的路线图（图 1）。面对日益增多的慢性肾功能衰竭患者，我们应当义无反顾、勇往直前，彻底揭开肾脏纤维化神秘的面纱，努力还人类一个健康的肾脏。

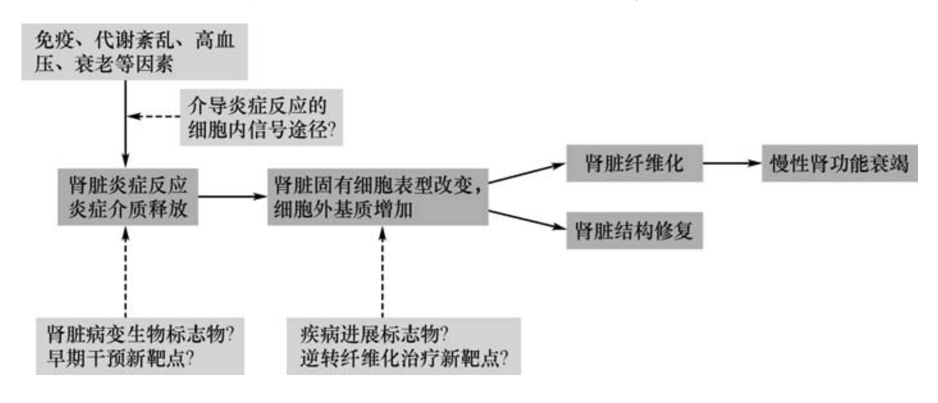


图 1　肾脏纤维化研究线路示意

参 考 文 献

Coresh J, Selvin E, Stevens LA, et al. 2007. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. JAMA, 298: 2038～2047

Kalluri R, Weinberg RA. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. J Clin Invest, 119: 1420～1428

Navarro-Gonzalez JF, Mora-Fernandez C. 2008. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. J Am Soc Nephrol, 19: 433～442

Stratta P, Canavese C, Sandri L, et al. 1999. The concept of “golmeulonephritis”: the fascinating history of evolution and emergence of a specialist's nosology focus on Italy and Torino. Am J Nephrol, 19: 83～91

Tyers M, Mann M. 2003. From genomics to proteomics. Nature, 422: 193～197

Wong W, Singh AK. 2001. Urinary cytokines: clinically useful markers of chronic renal disease progression? Curr Opin Nephrol Hypertens, 10: 807～811

Xu J, Lamouille S, Derynck R. 2009. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. Cell Res, 19: 156～172

Yang L, Besschetnova TY, Brooks CR, et al. 2010. Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. Nat Med, 16(5): 535～543

Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, et al. 2003. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. Nat Med, 9: 964～968

撰稿人：刘必成[1]　刘志红[2]

1 东南大学附属中大医院

2 南京军区南京总医院

肾脏损伤的修复与再生

Kidney Injury Repair and Regeneration

肾脏疾病已成为威胁人类健康的“隐形杀手”之一。肾脏固有细胞在肾脏病变过程中表现活跃，作用复杂。深刻认识肾脏固有细胞在生理、病理条件下的改变，将有助于深化对肾脏疾病发生机制及防治的理解。研究显示，干细胞可以分化为肾脏细胞或分泌生物活性因子参与肾损伤后的修复和肾脏再生。但目前尚不清楚骨髓干细胞是如何移入受损肾脏的？又是如何分化成各类肾脏细胞，从而修复肾损伤的？如何提高骨髓干细胞的肾向性率？这些都是在研究干细胞治疗肾脏疾病中所面临的重要疑难问题。随着干细胞研究的不断深入和进展，干细胞疗法将有望成为治疗肾脏疾病的主要方法。

肾脏是由多种类型细胞组成的复杂器官，许多肾脏疾病具有不可逆的特点，最终不可避免地进展到终末期肾功能衰竭，目前临床使用的肾脏替代治疗（即透析或肾移植）的效果仍不甚理想。如何促进肾脏损伤之后的修复与再生，是当今肾脏病学术研究领域的一大难题。

近年研究认为肾脏固有细胞在肾脏疾病过程中表现活跃，作用复杂。肾脏固有细胞（resident cell）种类较多，肾小球中主要有血管内皮细胞、肾小囊壁层上皮细胞、肾小囊脏层上皮细胞（足细胞）和系膜细胞。肾小管间质中主要有肾小管上皮细胞、间质成纤维细胞和间质树突状细胞。肾脏固有细胞参与了肾脏损伤后的修复过程。细胞水平的修复可以通过以下机制完成：①邻近损伤部位细胞增殖、填补固有细胞死亡后的空缺；②肾脏固有细胞去分化为幼稚表型细胞、通过增殖来修复；③肾脏固有细胞转分化，即从一种成熟表型去分化为幼稚表型，迁移至损伤部位，再增殖继而再分化为损伤的固有细胞表型；④肾脏组织中固有的成年干细胞募集至受损部位，激活后增殖并分化为所需表型；⑤来源于骨髓的干细胞迁移至肾脏，发生活化、增殖和分化。

干细胞移植已应用于临床某些疾病的治疗。在肾脏损伤修复方面，干细胞也显示了巨大的应用前景。研究表明，干细胞可以分化为肾脏细胞并参与肾损伤后的修复和肾脏再生。

1. 骨髓干细胞（BMSC）向肾细胞的分化

骨髓间充质干细胞在趋化因子的作用下可向多种组织器官迁移、定位并分化为相应的组织细胞，参与受损伤组织器官（包括肾脏）的修复。外源性骨髓间充

质干细胞能够定居于肾脏并且分化为肾脏细胞。Kale 等证实，移植骨髓间充质干细胞可显著降低血清尿素氮水平，促进肾功能恢复。研究发现，骨髓干细胞具有横向分化为肾脏细胞的能力，并参与损伤组织的再生和修复，干细胞的可塑性和无限增殖等特性为肾脏疾病的治疗提供了一个全新的研究空间。

2. 胚胎干细胞（ES 细胞）向肾脏细胞的分化

ES 细胞具有向机体内所有细胞分化的潜能。体外实验发现，在人的 ES 细胞培养液中加入一些生长因子，可诱导 WT-1 及肾素的表达。Steenhard 等模拟肾脏发育的微环境，将小鼠 ES 细胞注入小鼠胚肾内进行培养，数日后发现 ES 细胞可分化形成小管，并表达 Na^+-K^+-ATP 酶和近端肾小管的一些标记物；但总体来讲，ES 细胞分化形成肾脏细胞的效率较低。未分化的 ES 细胞在体内培养容易形成畸胎瘤，目前对人 ES 细胞的分选纯化技术还不成熟，诱导产生的肾细胞数量有限，因此距离临床试验研究还很远。

3. 肾脏内的干细胞（或祖细胞）向肾脏细胞的分化

肾脏发育过程分为前肾、中肾和后肾三个阶段，后肾间质细胞和输尿管芽上皮细胞相互作用形成成熟肾脏。部分后肾间质细胞，在诱导之后可分化成多种肾脏固有细胞，被认为是肾脏祖细胞。胚胎鼠的后肾间质细胞拥有能分化成上皮细胞、成纤维细胞和平滑肌细胞的器官特异性祖细胞，表明确实存在胚胎肾脏干细胞。出生之后，肾脏细胞更新过程极其缓慢但持续存在，而且肾脏损伤后同样有一部分细胞自我复制。目前还未能从肾脏中分离出一种符合干细胞标准的特定细胞，但注射溴脱氧尿苷（BrdU）后发现，在肾脏中（尤其肾乳头部位）存在一些慢周期细胞，当肾脏缺血损伤时，这些细胞数目减少，推测可能迁移到损伤部位用于肾脏的修复。肾乳头细胞分离后体外培养，可检测到上皮和神经的细胞标志物，表明位于肾乳头部位的 BrdU 标记细胞可扩增并参与肾脏修复。推测肾小管上皮细胞同样有可能参与肾脏损伤的修复。

4. 固有细胞在肾脏再生修复中的作用

肾脏损伤之后，需要大量细胞再生来修复被破坏的结构。在损伤后 24～48 小时，肾小管内出现大量表达波形蛋白（vimentin，基质标志物）和 Pax2 基因（肾发育过程标志物）的细胞，提示通过上皮细胞去分化和扩增而参与肾脏修复再生的作用机制。Lin 等应用 GFP 转基因小鼠建立肾损伤修复模型，通过检测 GFP 细胞 BrdU 的表达情况（标记肾内细胞来源）和 Y 染色体的表达情况（标记骨髓细胞来源），发现参与肾脏修复再生的细胞 89% 来源于肾内细胞，11% 来源于骨髓干细胞并主要表达在肾间质；在 GFP 阳性成熟上皮细胞中有波形蛋白的表达，也是健存上皮细胞在肾小管修复过程中发生去分化的直接证据。

5. 干细胞分泌生物活性因子促进肾脏的损伤修复和再生

未受损的肾脏中只有 3%～8% 来自骨髓干细胞的分化，以维持肾脏细胞的

正常自我更新，当肾脏受到损伤后，肾脏中骨髓干细胞分化的细胞只能增加到11%～12%，远远少于肾脏修复所需要的细胞数量。如此少量的干细胞不大可能只通过直接增殖分化来修复大量坏死的肾细胞；此外，最近的研究显示，不含细胞的干细胞培养液也能够促进肾脏的损伤修复，提示干细胞可以分泌一些生物活性因子，促进残余肾固有细胞增殖分化，这些生物活性因子主要由干细胞的分泌微泡和生长因子组成。已有研究发现，微泡可以促进急性肾损伤肾小管上皮的修复。

虽然系列动物实验都倾向于骨髓来源的间充质干细胞具有向肾脏细胞分化的能力，可修复肾损伤，但目前尚不清楚是哪种干细胞向肾脏细胞分化？骨髓干细胞是如何移入受损肾脏的？在受损肾脏的微环境下，又是如何分化成各类肾脏细胞，如何分泌生物活性因子促进肾固有细胞的增殖分化。骨髓中的干细胞含量极少，如何提高骨髓干细胞向肾脏细胞转化的比率也是在干细胞治疗肾脏疾病研究领域中所面临的重要问题之一。

随着干细胞研究技术和应用水平的不断深入，干细胞向肾脏细胞分化的研究将会取得新的进展，干细胞疗法也将成为肾脏疾病的主要治疗方向，尤其是自体骨髓干细胞移植是一个很好的选择，可以减少免疫反应和伦理问题。目前的研究大多局限于急性肾功能衰竭的治疗，已经取得了一定的治疗效果，推测将来骨髓干细胞移植对慢性肾功能衰竭的治疗将会有更广阔的应用前景。

参 考 文 献

Bruno S, Grange C, Deregibus MC, et al. 2009. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. J Am Soc Nephrol, 20(5): 1053～1067

Hu K, Kenk L, de Vries U, et al. 2007. Chemically defined medium environment for the development of renal stem cells into tubules. Biotechnol J, 22(8): 992～995

Ito T, Suzuki A, Imai E, et al. 2001. Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling. J Am Soc Nephrol, 12(12): 2625～2635

Lin F, Moran A, Igarashi P. 2005. Intrarenal cells, not bone marrow-derived cells, are the major source for regeneration in postischemic kidney. J Clin Invest, 115(7): 1756～1764

Morigi M, Imberti B, Zoja C, et al. 2004. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. J Am Soc Nephrol, 15(7): 1794～1804

Oliver JA, Maarouf O, Cheema FH, et al. 2004. The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. J Clin Invest, 114(6): 795～804

Romagnani P, Kalluri R. 2009. Possible mechanisms of kidney repair. Fibrogenesis Tissue Repair, 2(1): 3

Sagrinati C, Ronconi E, Lazzeri E, et al. 2008. Stem-cell approaches for kidney repair: choosing the

right cells. Trends Mol Med, 14(7): 277～285

Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, et al. 2000. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA, 97(21): 11307～11312

Steenhard BM, Isom KS, Cazcarro P, et al. 2005. Integration of embryonic stem cells in metanephric kidney organ culture. J Am Soc Nephrol, 16(6): 1623～1631

撰稿人：刘志红　谢红浪　何群鹏
南京军区南京总医院

白血病系统生物学

Systems Biology of Leukemia

系统生物学是研究一个生物系统中所有组成成分（基因、mRNA、蛋白质及小分子物质等）的构成，以及在特定条件下这些组分间的相互关系的学科。系统生物学从细胞、组织、器官和生物体整体水平研究结构和功能各异的各种分子及其相互作用，并通过计算生物学定量描述和预测生物功能、表型和行为，是一个对各种分子生物学数据逐步整合的过程，注重以整体的理念分析各种生物分子相互作用形成的网络对生命活动的调控，主张综合利用生物信息学及各种数学方法对数据分析处理，从而寻找规律，揭示自然界生物体所蕴涵的奥秘。人类基因组测序完成之后，随着基因组学、蛋白质组学、代谢组学、生物信息学和计算生物学的相继兴起，系统生物学得以蓬勃发展。

白血病是一组严重危害人类健康的恶性血液肿瘤，近来虽有重大进展，但多数类型白血病的治疗仍最终失败。机制上，白血病是在外因作用下，机体发生复杂遗传学变异的结果。迄今已发现大量染色体易位及基因突变，但在系统层次上了解白血病的机制，仍是我们面临的挑战。白血病发生的造血系统之所以适合开展系统生物学研究，是因为有如下特点：①造血系统代表了一个完整的生物系统，总体而言，其结构相对简单，利于开展系统性研究。②目前对造血系统的组成成分及相互关系和调节机制研究进展较快，积累较多，是一个难得的系统生物学研究对象。③血液细胞便于提取和分离，而且白血病发病机制有了很大进展，动物模型相对实体瘤来说比较成熟。更为可喜的是，近年有效的白血病治疗药物和治疗方案都有很大的突破，如果充分利用这些优势，将系统生物学的方法和技术全方位地用于白血病研究，将为我们最终阐明白血病的发生规律、为人类最终战胜白血病奠定基础。

目前白血病系统生物学研究面临很大的挑战，有许多难点需要破解。首先，尽管一些白血病有特征性的致病融合蛋白，其致病机制仍然是高度复杂的：既涉及基因分子水平的变异，也有基因表达调控网络包括转录因子和诸如表观遗传的紊乱，还有细胞内信号分子系统的异常，同时牵涉到各种细胞之间的调控失衡如旁分泌异常。具体到细胞水平，白血病往往表现出造血干/祖细胞的恶性增殖、细胞分化受阻和凋亡逃逸的各种特征，在机体水平则引起免疫功能低下，并发各种病症。因而如何充分应用系统生物学方法和技术平台从基因组、转录组、蛋白

质组及代谢组水平深入地发掘各种影响白血病发生、发展和恶化的基因、蛋白质及小分子等分子信息是进行白血病系统生物学研究的重要前提和基础。其次，迫切需要发展计算生物学和生物信息学的方法和技术平台，充分整合白血病基因组、转录组、表观基因组、蛋白质组、代谢物组等研究产生的数据，并鉴定与疾病表型相关的生化途径、信号通路及分子网络结构，阐明其调控机制，模拟疾病的分子、细胞和机体水平的模型，对白血病发生、发展和转归产生全面而深入的认识。达到由只能对白血病的定性式描述变成能对白血病进行定量式描述并进行科学性预测的转变。再次，要想从各种海量的信息分子及众多的分子网络中寻找到控制白血病发生、发展和转归的关键节点分子，既需要生物计算和信息处理、整合能力，还需要发展合适的白血病动物模型，对相关分子的作用进行整体水平的验证。目前虽然有几类白血病的动物模型比较成熟，但其他种类可以应用的白血病动物模型很有限，而且已有的动物模型仍有待改善，以便更好地模拟白血病体内发病的特征。最后，白血病系统生物学研究的不是一种静止状态，而是一种动态过程，即研究系统在不同条件下和不同时间内所具有的不同动力学。相应地，白血病系统生物学数据的利用就需要符合这种动态数据的条件。特别是在白血病治疗过程中，虽然是相同的病症，不同患者的用药和治疗方案应该针对各个不同病人的分子个性特征设计，进行所谓的白血病个性化治疗方案，因而开发快速简便的诊断手段和仪器也是白血病医生和科技工作者面临的一大难题。

那么如何解决白血病系统生物学研究所面临的难题呢？首先，需要清楚的是白血病系统生物学研究是一项巨大的工程，充分借鉴和灵活应用各种学科的技术和平台，进行多学科交叉研究尤其要依赖生物信息学、计算生物学等学科的先进技术和方法是白血病系统生物学研究的基本方向。其次，白血病与其他肿瘤一样不仅仅是单一的局部器官疾病，更是一种系统性疾病，是全身性疾病的局部反应。开展白血病系统生物学研究时，不仅要关注造血系统的变化，更应该在整体水平研究机体其他器官和系统与它的联系及影响。再次，目前白血病多药物联合靶向治疗的理念得到了广泛的认识，我国学者在这方面做出了杰出的贡献。值得注意的是，他们充分吸收了中国传统的中医用药的辨证思想。事实上，系统生物学尤其是机体系统性调控概念，与中医的系统理论、整体观有不谋而合之处，有所扬弃的借鉴和利用中医治疗的策略，是破解白血病系统生物学研究难点的有效途径之一。中西医结合的治疗模式也许是肿瘤治疗的重要趋势。最后，应该看到的是，我国的白血病基础研究和临床研究方面有雄厚的基础，近些年来已经连续开展了白血病相关的重大项目研究，并取得了令世人瞩目的成就。建立在这些重大成果基础上的白血病系统生物学研究必将为我国医学和新药创制做出重大贡献。

参考文献

Auffray C, Chen Z, Hood L.2009. Systems medicine: the future of medical genomics and healthcare. Genome Medicine,1:2～11

Hood L, Heath JR, Phelps ME,et al.2004.Systems biology and new technologies enable predictive and preventative medicine. Science,306:640～643

Hood L.1998. Systems biology: new opportunities arising from genomics.proteomics and beyond.Experimental Hematology,26:681

Hood L.2003. Systems biology: integrating technology, biology, and computation. Mech Ageing Dev,124:9～16

Ivakhno S.2007. From functional genomics to systems biology. FEBS J,274:2439～2448

Kitano H.2002. Systems biology:a brief overview. Science,295:1662～1664

Ohvai ZN, 2002.Barabesi AL. Systems biology, life's complexity pyramid.Science,298:763～764

Wang L, Zhou GB, Liu P,et al.2008. Dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula Realgar-Indigo naturalis as an effective treatment for promyelocytic leukemia. Proc Natl Acid Sci USA,105:4826～4831

Wang ZY, Chen Z.2008. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. Blood,111:2505～2515

撰稿人:陈赛娟[1]　周光飚[2]
1 上海交通大学附属瑞金医院
2 中国科学院动物研究所

造血干细胞：生物学和应用

Hematopoietic Stem Cell：Biology and Applications

造血干细胞可能是科学家了解得最多的一种成体干细胞类型，并早已在临床上广泛应用于移植后造血系统的重建。目前我们了解到在人和绝大多数动物的成熟个体中，造血干细胞主要定居在骨髓组织中。造血干细胞具有强大的自我更新（self-renewal）样扩增能力和通过分化（differentiation）产生所有造血细胞系列的潜能。理论上讲，在合适的宿主体内，单个造血干细胞可通过自我更新样扩增和分化过程重建整个造血系统并维持其终身。近一个世纪的研究工作逐渐揭示造血系统的新陈代谢现象，外周成熟的各血细胞系列在体内仅能存活短暂的时间（如人红细胞的平均寿命为 120 天），而造血干细胞终身的自我更新样增殖和分化的活力可保证个体造血细胞的数量在生理情况下保持相对稳定。

在 20 世纪上半叶细胞血液学作为一门学科开始之际，研究人员即意识到造血干细胞的存在。医生和生物学家早已观察到人和动物在外伤失血之后，经一段时期的修养个体的血细胞数量可恢复到生理的平衡状态，提示体内存在一个不断重新产生各系列成熟造血细胞的源头——造血干细胞。但据文献记载，最早提示“造血干细胞存在于成熟动物个体”的科学证据见于 1945 年 Ray Owen 发表的文章。Owen 观察到在异卵双生子（non-identical twins）牛（曾共用同一个胎盘）的成熟个体体内，终身存在由两种遗传背景的造血细胞系列组成的嵌合体。考虑到在怀孕期双生子胚胎之间的血细胞交换仅发生于一个短暂的过程，对这种稳定的血细胞嵌合体现象的一个解释为：胚胎期交换的血细胞含有一种长命的造血干/祖细胞，其扩增能力可保持至成体，并具备终身产生各系列血细胞的能力。同年，美军在日本使用原子弹以后，医务人员开始观察到辐射受害者的主要死亡原因为造血衰竭，这导致一系列辐照后造血再生研究工作的兴起。1955～1956 年数个研究小组先后报道异种或异体鼠骨髓细胞可重建致死性辐照小鼠的造血系统，为成体造血干细胞的存在提供了初步的实验依据。

开展现代细胞生物学研究的基础性工作，也是第一要克服的难题是在体内外环境中、在单细胞水平对研究对象进行分离和示踪。1963 年，McCulloch 和 Till 等发现骨髓细胞移植后小鼠“10 天脾集落”（day 10 spleen colony）中所有细胞均来源于单个祖细胞，故提出造血细胞产生的“克隆性”（clonal）概念。20 世纪 70 年代以来，随着“骨髓移植”技术进入临床应用，临床医生和研究人员逐

渐接受“骨髓中存在的稀少造血干细胞才是供者造血系统在受者体内长期植活的最终细胞学原因”的观点，造血干细胞的分离和鉴定遂成为一个明确的细胞生物学问题。近 20 年来，主要由于各造血系列标志性抗原的鉴定和相应免疫学抗体技术的制备、细胞流式分析和分选技术的发明、遗传学理论和技术的发展和应用，以及免疫缺陷和同系小鼠的培育，在人和小鼠造血干细胞的分离鉴定方面研究人员取得了长足的进步。譬如，我们现在可利用一些表面标示分子的组合将成体造血干细胞高度浓缩于很小的细胞亚群（≤10 个细胞）中。但实际上，我们对造血干细胞的许多基本生物学特性的认知尚不清楚，尚未达到在单个细胞水平高效分离造血干细胞的水准。除了科学家尚需认知更多的膜表面分子以外，使问题复杂化的部分原因可能在于某一个体体内存在不止一种亚型的造血干细胞。它们处在相近但不同的发育分化阶段和（或）不同的细胞周期状态及不同的造血器官，它们可表达不同组合的膜表面分子。从干细胞研究的历史看，一些目前未知的新的研究手段和策略的出现可能是最终攻克这一难题的一个有利条件。

在骨髓移植的临床实践中，寻找合适供体提供足够数量的骨髓是一难以克服的瓶颈。显而易见，建立造血干细胞体外扩增方法将使其所带来的大多数社会和经济难题迎刃而解。另外，造血干细胞体外扩增也是开展以造血干细胞为载体的基因治疗的一个技术基础。遗憾的是，虽然分离纯化之造血干细胞在体内具备有效的自我更新样扩增和分化能力，其在体外培养条件下则经历倾向性分化过程产生髓系细胞，从而快速中止造血过程。目前，医学研究人员尚不能在体外简单培养系统中模拟造血干细胞体内扩增的过程，安全和有效地在体外扩增造血干细胞仍是血液学家的一个梦想。所以不难理解，造血干细胞面临自我更新和分化双向选择时如何取向及内在分子调控机制是血液学分子生物学家近 10 年来、可能也是未来 10 年最为热衷解决的难题之一。主要基于多种基因修饰小鼠模型的建立和其他细胞和分子生物学研究手段的进步，研究人员目前已发现数条正性调控造血干细胞自我更新扩增和维持长期“干性”（stemness）的分子通路，如 Wnt-β-catenin、Notch 和 Hedgehog 分子通路，虽然这仅代表了调控造血干细胞自我更新或分化过程的内在分子机制的一小部分。另外，许多研究人员相信，对调控造血干细胞自我更新或分化选择的分子机制的了解将极大地促进对白血病发病机制的了解，反之亦然。科学家推测：至少部分类型白血病的发生是源于造血祖细胞重新激活了本已该静默的、正性调控造血干细胞自我更新扩增的分子通路。

与此问题相关，近年来一部分研究人员将研究重点转向对造血干细胞微环境（包括细胞和分子机制）的分析，认识到造血干细胞在体内外的扩增或分化的选择在极大程度上取决于某种微环境因素存在与否。即使研究人员在短期内不能清晰了解和操控造血干细胞自我更新扩增内在分子机制，但一旦在模拟体内龛（niche）机制方面取得突破，体外选择性扩增造血干细胞可成为现实。近年来血

液学领域的一大突破就是开始对造血干细胞龛细胞组分的认知，虽然目前来看，存在几种造血干细胞龛结构依然是一未完全解决的重要问题。有趣的是，在白血病的研究工作中，科学家也开始注意到白血病干细胞的长期生存和扩增也需要体内造血微环境的支持，所以对造血微环境的认知也将为白血病的治疗提供新的思路。

有理由相信，随着新技术的不断发明和研究人员的不懈努力，在未来的10～20年中，不同类型单个造血干细胞的精确分离和示踪、控制自我更新和分化选择的细胞内外机制的认知等难题将有可能被破解。这些新的知识除了对多种难治血液病的治疗有直接的帮助外，值得一提的是，其对体内其他类型的成体干细胞的研究也有重要的示范作用。

参 考 文 献

Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. 1963. Cytologic demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. Nature, 197: 452～454

Lymperi S, Ferraro F, Scadden DT. 2010. The HSC niche concept has turned 31. Has our knowledge matured? Ann N Y Acad Sci, 1192(1): 12～18

Nowell PC, Cole LJ, Habermeyer JG, et al. 1956. Growth and continued function of rat marrow cells in X-radiated mice. Cancer Res, 16: 258～261

Owen RD. 1945. Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins. Science, 102: 400～401

Schroeder T. 2010. Hematopoietic stem cell heterogeneity: subtypes, not unpredictable behavior. Cell Stem Cell, 6(3): 203～207

Wang Y, Krivtsov AV, Sinha AU, et al. 2010. The Wnt/β-catenin pathway is required for the development of leukemiua stem cells in AML. Science, 327: 1650～1653

Weissman IL, Shizuru JA. 2008. The origin of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autonomous diseases. Blood, 1998: 3543～3553

撰稿人：诸 江

上海交通大学医学院附属瑞金医院

强直性脊柱炎的遗传学机制

Genetic Mechanisms of Ankylosing Spondylitis

强直性脊柱炎（ankylosing spondylitis，AS）是一种以累及骶髂关节和椎旁小关节和肌腱韧带骨附着点为主，具有多种关节外表现的慢性炎症性疾病，是血清阴性脊柱关节病（seronegtive spondyloarthropathy，SpA）的原型，也是 SpA 中最常见的一种。主要累及青壮年，80% 的患者发病年龄小于 30 岁。总体发病率为 0.3% （0.1% ～1.4% ）。本病病程漫长，晚期可引起脊柱畸形和关节强直，导致其残疾和劳动力丧失，严重降低患者生活质量。早在 1973 年，Brewerton 和 Schlosstein 研究发现在 AS 患者中 HLA-B27 阳性率可达 90% ，开启了强直性脊柱炎遗传学机制研究的历史。流行病学调查发现，各人群 AS 的患病率基本与 HLA-B27 阳性率平行。HLA-B27 阳性 AS 患者的 HLA-B27 阳性亲属中发病率为 25% ～50% ，而随机选择的 HLA-B27 阳性个体发生疾病的概率可能仅为 2% ～10% 。HLA-B27 阳性的 AS 患者的 HLA-B27 阳性的一级亲属患 SpA 的可能性较 HLA-B27 阳性的普通人群中的个体大得多，有 11% ～29% 的 AS 患者 HLA-B27 阳性的一级亲属发病，呈现明显的家族聚集性。HLA-B27 阳性的个体患 SpA 的危险性较阴性者大 100 倍。那么，HLA-B27 阳性就意味着强直性脊柱炎吗？目前认为 AS 是一种多基因遗传病（polygenic genetic disease），遗传因素起着主导作用，但与该病有关的易感基因到底有多少，其在 AS 发病中的具体机制是什么仍不清楚，这是强直性脊柱炎的分子遗传学机制研究所面临的重大难题。

HLA-B27 具有多种亚型。HLA-B27 被认为是与 AS 关系最为密切的基因，而 HLA-B27 基因具有高度的多态性。迄今为止，已经发现的 B27 亚型达到了 50 多个。在所有 B27 亚型中，B＊2705 分布最广，几乎见于所有人种。因此，有人推测其他亚型可能都是从 B＊2705 突变进化而来的。其中 B＊2701、B＊2702、B＊2703、B＊2704、B＊2705、B＊2707、B＊2710 等被证实与 AS 相关。与强直性脊柱炎最相关的亚型是 HLA-B＊2705、B＊2702、B＊2704 和 B＊2707，中国汉族 B2704 亚型频率最高（50.9% ），其次为 B2705（40.7% ），B2704 比 B2705 与 AS 更相关。

HLA-B27 分子与关节炎 AS 发生的机制尚不十分清楚，目前存在有三种主要的假说。①分子模拟假说（molecular mimicry）：认为 HLA-B27 分子或 B27

相连肽段与某些病源肽段相似，因此成为一些抗体和（或）$CD8^+$ T 细胞攻击的靶标，或者 HLA Ⅱ类分子提呈与 B27 相连的肽段，刺激 $CD4^+$ T 细胞反应；②HLA-B27异常形式的免疫识别：细胞表面存在多种 B27 异常形式，包括自由重链、重链同源二聚体等，可被特异的 $CD4^+$ T 细胞、NK 细胞等识别，促进 $CD4^+$ T 细胞增殖，炎症信号转导，细胞因子释放，促进炎细胞聚集，从而诱发炎症损伤；③HLA-B27 错误折叠及内质网应激引起未折叠蛋白反应（UPR）：未折叠的重链在内质网内大量堆积，形成了"未折叠蛋白反应"（unfolded protein response，UPR），导致 IL-23R 表达增高、IL-23/Th17 细胞轴异常及其他前炎性细胞因子的活化。

除 HLA-B27 以外，HLA 区域内及 HLA 区域外的其他基因也参与 AS 发病，包括 HLA-B60、HLA-DRB1*0101、HLA-DR4、MHC（HLA class）Ⅱ、低分子蛋白酶体（LMP）、抗原加工相关转运子（TAP）、MICA 基因、肿瘤坏死因子 α（TNF-α）、热休克蛋白 70 基因以及细胞色素 P450 2D6（cytochrome P450 2D6，CYP2D6）、IL-1Rα、IL-6、IL-10 基因等。在非 HLA 基因中，最关联的是 IL-1 基因家族。尽管已经确定了众多与 AS 关联的基因，AS 发病的遗传基础仍然不清楚，研究 AS 的遗传学机制有助于更好地理解该病及血清阴性脊柱关节病 SpA 的发病机制，为 AS 的早期诊断和特异性治疗提供理论依据。

目前研究多基因疾病基因的基本思路：①寻找与某疾病基因密切连锁的遗传学标志；②利用这些遗传标志将疾病的基因定位于染色体的某一区段；③通过在该区段内寻找更小的遗传标志，或通过测序寻找疾病基因。定位易感基因的具体方法有：①受累同胞对分析方法——ASP 法（affected sib-pair，ASP）。该方法通过患病同胞定位出与疾病易感基因连锁的遗传标志，无须知道明确的疾病遗传方式，但为了排除遗传异质性的影响，需要收集数百个受累同胞对，收集标本的难度和研究成本较大。②受累家系成员分析方法——APM 法（affected pedigree member，APM）。该方法将分析对象扩大到整个家系的所有成员，取材容易，但分析遗传标记和易感基因之间的遗传效能低于 ASP 法。③关联研究（associated study）分析和连锁不平衡分析（linkage disequilibrium，LD）。关联研究主要分为基于群体的病例对照关联研究（case-control based association study）和基于家系的关联研究（family-based association study）两大类，该方法以群体研究为对象，通过遗传标志与易感基因的连锁不平衡关系定位易感基因，较 APM 法更精确。为了减少关联分析的盲目性，需要提高找到疾病易感基因的效率。

寻找多基因遗传病易感基因的策略主要有：候选基因关联研究策略和全基因组关联研究策略。全基因组扫描是疾病遗传机制研究的关键步骤，其结果可将疾病相关位点定位于染色体的某个区域，以利于进一步进行定位克隆和连锁不平衡分析进行基因定位。近年来国内外学者对不同地区不同人种的多个 AS 患者家系

进行多次大样本的全基因组扫描，不仅证实6号染色体短臂的HLA基因区域（含HLA-B27）与AS的连锁关系最强，而且发现位于10q、16q、1q、3q、5q、6q、9q、17q及19q染色体上的一些位点均与AS病情相关。最近多所研究机构的科学家使用全基因组关联分析技术，找到了4个与强直性脊柱炎（ankylosing spondylitis）相关的基因，研究人员对比了2000多名强直性脊柱炎患者和5000多名正常人的基因组图谱，发现2p15、21q22、ANTXR2与IL1R2四个非MHC易感基因位点，并证实另两个非MHC位点IL23R与ERAP1也与AS明显关联，这为针对这些基因座开发出有针对性的靶向治疗药物奠定了基础。

全基因组关联研究不仅可以提供更为完整的强直性脊柱炎遗传易感基因图谱，也为进一步明确HLA-27在该病发病机制中的作用提供了新的线索。新出现的第三代基因测序技术，将对AS的易感基因以及其后续深入研究起到重要的作用。此外，随着肿瘤坏死因子拮抗剂在临床上的广泛使用，AS已经进入生物制剂治疗时代，药物遗传学的研究有利于进一步明确AS患者对新型生物制剂不同反应的生物学基础，也将促使人们进一步阐明AS的遗传学机制；进一步采用功能基因组学手段，研究基因型与表型之间的联系，将为最终阐明这种多基因遗传病发病机制，为疾病预警、临床诊断及新药开发奠定基础。

参考文献

Allen RL, Trowsdale J. 2004. Recognition of classical and heavy chain forms of HLA-B27 by leukocyte receptors. Curr Mol Med, 4(1): 59～65

Brewerton DA, Caffrey M, Hart FD, et al. 1973. Ankylosing spondylitis and HLA-27. Lancet, i: 904～907

Colbert RA, DeLay ML, Klenk EI, et al. 2010. From HLA-B27 to spondyloarthritis: a journey through the ER. Immunol Rev, 233(1): 181～202

Davenport MP. 1995. The promiscuous B27 hypothesis. Lancet, 346(8973): 500～501

Eid J, Korlach J, Turner S, et al. 2009. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. Science, 323(5910): 133～138

Reveille JD, Brown MA 2010. Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci. Nat Genet, 42(2): 123～127

Said-Nahal R, Miceli-Richard C, Gautreau C, et al. 2002. The role of HLA genes in familial spondyloarthropathy: a comprehensive study of 70 multiplex families. Ann Rheum Dis, 61(3): 201～206

Schlosstein L, Terasaki PI, Bluestone R, et al. 1973. High association of an HLA antigen, W27, with ankylosing spondylitis. New Engl J Med, 288: 704～706

Scofield RH, Warren WL, Koelsch G, et al. 1993. A hypothesis for the HLA-B27 immune dys-

regulation in spondyloarthropathy : contributions from enteric organisms , B27 structure , peptides bound by B27 , and convergent evolution . Proc Natl Acad Sci USA , 90(20):9330～9334
Thomas GP , Brown M A .2010 . Genetics and genomics of ankylosing spondylitis .Immunol Rev , 233(1):162～180

撰稿人:朱　平　贾俊峰
第四军医大学西京医院

系统性红斑狼疮的遗传发病机制

Genetic Mechanisms Underlying Systemic Lupus Erythematosus

1. 背景

系统性红斑狼疮（systemic lupus erythematosus，SLE）是一个累及多系统、多器官、临床表现复杂的自身免疫性疾病，其发病机制复杂，被认为是自身免疫病的原型。SLE 以产生不同的自身抗体、形成抗原-抗体免疫复合物、慢性炎症反应为特征。临床上的多器官受累（包括肾脏、血液系统及中枢神经系统等）在 SLE 中普遍存在，并且成为 SLE 潜在的致死因素。该病病情易反复，目前临床上无治愈手段。由于这类疾病病因不明，目前缺乏特异性治疗手段和诊断指标，患者最终丧失生活能力或危及生命。因此，WHO 已把它与肿瘤、心血管病一起并列作为 21 世纪医学领域亟待攻克的堡垒。SLE 的患病率在国内人群中为 70/10 万，其中近 90% 的患者为女性。亚洲人群 SLE 疾病发生率和严重度较其他人种高，被认为是亚洲疾病（Asia disease）。因此，在 2002 年召开的 HUGO 世界人类基因组大会上，专家工作会议一致倡议将 SLE 定为亚太地区的主攻疾病。

2. 科学意义

多年来 SLE 的病因一直未明，可能因素包括遗传、性激素、药物、感染等。遗传因素在 SLE 发病中起重要作用。SLE 发病有家族聚集倾向，同卵双生子发病的一致率（25%～70%）明显高于异卵双生子（2%～10%）。SLE 作为一种典型的自身免疫综合征，具有多基因、多因素和异质性的特点，这种病的临床表现因个体不同而明显不同，目前还不知道特定的基因与 SLE 多样的临床表型（尤其是肾、脑等重要脏器受累）的对应关系，这增加了对其进行遗传研究的难度。研究 SLE 这种复杂疾病致病的遗传机制、药物基因组学相关基因多态性与药物疗效和安全性的相互关系，有助于更好地理解疾病的发病机制，为中国人群 SLE 的诊断、预防、特异性治疗药物的分子设计和安全有效用药提供理论依据，为发展 SLE 个性化医学奠定基础。

3. 最新进展

科学研究在 20 世纪 70 年代第一次发现了人类白细胞抗原（human leukocyte antigen，HLA）区域的基因变异与 SLE 相关，这拉开了 SLE 遗传机制研究的序幕。遗传学研究技术飞速发展，全基因组关联分析方法是伴随着人类基因组计划和单体型计划兴起的一种搜寻和鉴定复杂疾病易感基因的方法。利用这种方

法已经发现了100多种重大常见疾病和常见性状的500多个易感基因。最近在中国人群和欧洲人群以及犬狼疮模型中进行SLE的全基因组关联分析，取得了显著进展。迄今为止已经发现25个以上的基因与SLE相关，包括主要组织相容性复合体区域的等位基因、IRF5、ITGAM、STAT4、BLK、BANK1、PDCD1、PTPN22、TNFSF4、TNFAIP3、SPP1、C1q、C4、C2和一些Fcγ的受体等。其中一些基因已报道参与了免疫复合物、宿主免疫信号转导和干扰素通路等SLE的关键致病通路。其他基因位点还没有报道具有某些功能或明显的免疫学作用，但有可能与揭示SLE某些新的疾病发生机制有关。

4. 主要难点

SLE的遗传模式复杂，有多个基因参与，而每个基因在疾病中的效能可能是中等或弱效。SLE这样复杂的多基因疾病可能是由于同一代谢途径或信号转导途径上不同基因发生突变的结果，由多个微效基因的累加作用和某些环境因子（比如感染和激素等）作用所致。SLE遗传学研究表明，不同人种间具有相同和不同的易感基因，再加上通过全基因组关联分析得到的疾病相关单核苷酸多态性（SNP）仅是疾病的一小部分遗传特征，因此需要整合其他的组学技术在中国人群中发现更多的与SLE相关的遗传变异，包括以前较少报道的各类低频SNP、碱基插入或缺失、拷贝数目变异等。遗传学研究只是认识疾病的开始，从发现疾病相关的遗传变异到认识疾病的生物学机制，还有很多问题有待解决，比如疾病相关的遗传变异是怎样参与疾病发生发展的，遗传变异之间的相互作用以及遗传变异与某些环境因子的相互作用对疾病表型（尤其是SLE重要脏器受累的并发症）的影响等（图1）。



图1 遗传因素与环境因子共同作用参与系统性红斑狼疮的发生发展

5. 展望

结构基因组学和功能基因组学的发展将会大大推动SLE的遗传机制研究。利用新一代高通量的测序技术在中国人群中对疾病易感区域进行精细测序，鉴定新的遗传变异，利用临床资料齐全的病例-对照样本进行遗传学和流行病学研究，进一步鉴定与疾病复杂临床特征（重要脏器受累）相关的遗传特征。同时整合大样本的临床数据、基因型和基因表达谱，鉴定疾病关键致病通路，尤其是参与重要脏器受累的关键通路。皮肤细胞转化为多潜能干细胞（induced pluripotent stem cell，iPS）技术的出现为研究SLE的发病机制提供了新的疾病细胞模型。利用功能获得和功能缺失策略，在动物模型中研究狼疮易感基因参与疾病发生的

生物学机制。以上这些研究有望在 SLE 遗传学机制研究中取得突破，使将来根据病人遗传特征进行特异性、个体化的治疗成为可能。

参考文献

Ge B, Pokholok DK, Pastinen T. 2009. Global patterns of cis variation in human cells revealed by high-density allelic expression analysis. Nat Genet, 41(11): 1216～1222

Han JW, Zheng HF, Cui Y, et al. 2009. Genome-wide association study in a Chinese Han population identifies nine new susceptibility loci for systemic lupus erythematosus. Nat Genet, 41(11): 1234～1237

Harley IT, Kaufman KM, Langefeld CD, et al. 2009. Genetic susceptibility to SLE: new insights from fine mapping and genome-wide association studies. Nat Rev Genet, 10(5): 285～290

Harley JB, Kaufman KM, Kelly JA. 2008. Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PXK, KIAA1542 and other loci. Nat Genet, 40(2): 204～210

Moser KL, Kelly JA, Lessard CJ, et al. 2009. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. Genes Immun, 10(5): 373～379

Shen N, Tsao BP. 2004. Current advances in the human lupus genetics. Curr Rheumatol Rep, 6(5): 391～398

Tsao BP, Cantor RM, Kalunian KC, et al. 1997. Evidence for linkage of a candidate chromosome 1 region to human systemic lupus erythematosus. J Clin Invest, 99(4): 725～731

Wilbe M, Jokinen P, Truvé K, et al. 2010. Genome-wide association mapping identifies multiple loci for a canine SLE-related disease complex. Nat Genet, 42(3): 250～254

Yang W, Shen N, Lau YL. 2010. Asian Lupus Genetics Consortium. Genome-wide association study in Asian populations identifies variants in ETS1 and WDFY4 associated with systemic lupus erythematosus. PLoS Genet, 6(2): e1000841

撰稿人：沈　南　鲍春德

上海交通大学医学院附属仁济医院

碘摄入量与甲状腺疾病的关系

Iodine Intake and Thyroid Diseases

碘是自然界普遍存在的一种元素，是人类生存的生态环境中一个极为重要的元素。在人体，碘是合成甲状腺激素的主要原料。已经知道碘摄入量与甲状腺疾病呈现“U”形曲线关系，即碘摄入量过低或过高都会导致甲状腺疾病。如何控制补碘剂量的安全范围、防止碘缺乏的同时又要避免碘摄入过量，一直是国内外科学家关心的热点问题。

1. 人体所需的碘元素量

正常状态下，细胞外液碘离子浓度为 0.6μg/L，细胞外液碘离子总量为 150μg。甲状腺每天从细胞外液碘池摄取碘离子 120μg，其中 60μg 用于合成甲状腺激素（T_3、T_4），其余 60μg 返回细胞外液碘池。在甲状腺内以甲状腺激素和碘化酪氨酸形式储存的有机碘高达 8～10mg，每天甲状腺释放 60μg 激素碘。有研究显示，甲状腺合成 100μg T_4需要碘原料 65μg，外源性 T_4 100μg 即可以重建甲状腺全部切除患者的甲状腺功能，甲状腺为合成生理需要的甲状腺激素对碘的基础需要量是 65μg/d，要消除碘缺乏病的全部表现，每天需要补充碘 100μg。

2. 碘摄入量推荐标准

2001 年，世界卫生组织（WHO）、联合国儿童基金会（UNICEF）、国际防止碘缺乏病理事会（ICCIDD）提出了人类碘摄入量的推荐供给量标准（表 1），推荐供给量已经是人体基本需要量的 2.5 倍；同年，WHO 公布了碘缺乏病的流行病学判断标准（表 2），同时确定了足量碘摄入、超足量碘摄入和过量碘摄入的定义和计量范围（表 3），以尿碘中位数（MUI）判断碘摄入量。WHO 解释，总的来说，不应当鼓励碘摄入量超过 MUI 300μg/L，特别是在原来碘缺乏地区。因为碘过量可以导致对健康的不良影响，包括碘致甲状腺功能亢进症（碘甲亢，IIH）和自身免疫性甲状腺病（AITD）等。

表 1　WHO、UNICEF、ICCIDD 推荐的碘摄入量标准

年龄（岁）	碘摄入量（μg/d）	年龄（岁）	碘摄入量（μg/d）
＜6	90	＞12	150
6～12	120	妊娠或哺乳妇女	200

表 2　WHO 公布的碘缺乏病流行病学判断标准

	轻度	中度	重度
新生儿全血 TSH＞5mU/L 比例（%）	3.0～19.9	20.0～39.9	＞40
学龄儿童甲状腺肿率（%）	5～19.9	20.0～29.9	＞30
尿碘中位数 MUI（μg/L）	50～99	20～49	＜20
儿童、成人血清甲状腺球蛋白（Tg）中位数（μg/L）	10.0～19.9	20.0～39.9	＞40.0

表 3　依据学龄儿童的尿碘评价碘营养状态的流行病学标准

尿碘中位数（μg/L）	碘摄入量	碘营养状态
＜20	不足	重度碘缺乏
20～49	不足	中度碘缺乏
50～99	不足	轻度碘缺乏
100～199	足量	适宜
200～299	超足量	易感个体有发生 IIH 危险
≥300	过量	发生 IIH 和 AITD 的危险

注：IIH. 碘致甲状腺功能亢进症；AITD. 自身免疫性甲状腺病。

3. 碘与甲状腺肿

早在 1938 年，就有报道日本北海道地区甲状腺肿的发生率为 6%～12%，患者尿碘高达 8～24mg/d。1987 年，国外学者报道我国山西省水源性高碘地区（水碘含量为 462.5μg/L）儿童甲状腺肿的患病率高达 65%。20 世纪 70 年代，我国学者提出尿碘与甲状腺肿发病呈“U”形曲线关系，即尿碘＜50μg/(g·Cr)时甲状腺肿发生率和尿碘呈反比，而尿碘＞900μg/(g·Cr)时两者成正比。

4. 碘与甲状腺功能亢进症（简称甲亢）

碘导致甲亢与该地区补碘前的碘营养状况密切相关。中重度碘缺乏地区补碘后甲亢的发病率增高明显，而轻度碘缺乏和非碘缺乏地区的研究结果与上述结论并不完全一致。世界上多个国家推行全民食盐加碘（USI）后，多有报道发现补碘后甲亢发病率显著增加，碘摄入量增加是弥漫性甲状腺肿伴甲亢（Graves 病）发生的一个独立危险因素。中国医科大学碘致甲状腺疾病课题组于 1999 年开始对辽宁省、河北省 3 个不同碘摄入量农村社区（MUI 分别为 103μg/L、374μg/L、615μg/L）进行调查，对比观察了 3761 例居民甲状腺疾病的患病率、发病率及疾病谱的变化，历时共 5 年，随访率达到 80.2%。结果发现，轻度碘缺乏区补碘至碘超足量，8 年后甲亢的发病率未见明显上升，水源性高碘社区（MUI 615μg/L）实行 USI 后也未引起甲亢发病率增加，从而在国际上首次提出轻度碘缺乏地区补碘不会导致甲亢的增加。

碘摄入量增加引起的甲亢中有一部分是来自于碘对自身免疫性甲状腺病的影响。塔斯马尼亚地区供应碘化面包后，甲亢发病率由 0.018% 上升到 0.059%，其中 54% 的患者甲状腺刺激性抗体（TSI）阳性。Solomon 等曾在 1973 年和 1987 年两次随访研究 494 例患者 20 年期间抗甲腺药物治疗 Graves 病的缓解率与碘摄入量之间的关系，发现缓解率从 1963 年的 60%～80% 下降至 1973 年的 13%～20%，1987 年缓解率又回升至 50.6%，其波动与同期饮食中的含碘量的变化呈线性关系。这表明碘摄入量增加后，一方面引起了易感人群自身免疫性甲亢的发生，另一方面也降低了 Graves 病的缓解率。

5. 碘致甲状腺功能减退症（简称甲减）

碘致甲减问题越来越受到人们的关注和重视。在长期碘摄入过量地区，临床与亚临床甲减比碘致甲亢更常见。1997 年，Szabols 对 MUI 分别为 72、100、513μg/L 的 3 个地区的老年人的调查显示，随碘摄入量增加，甲减发生呈增加的趋势，引起甲减的主要原因是自身免疫甲状腺炎。阿尔伯格（MUI 53μg/L）和哥本哈根（MUI 68μg/L）分别为中度和轻度碘缺乏地区，虽然 MUI 相差甚微，但哥本哈根的临床甲减发病率为阿尔伯格的 1.5 倍。可见甲减更易受到碘摄入量的影响。

滕卫平等研究发现，碘超足量和碘过量地区临床甲减的患病率呈现 3.5 倍和 7.3 倍增高，亚临床甲减的患病率呈现 3.2 倍和 6.6 倍增高，亚临床甲减的累积发病率呈现 11.3 倍和 12.6 倍增高，此外，首次证实碘缺乏地区补碘至超足量可以促进亚临床甲减发展为临床甲减。

6. 碘致自身免疫甲状腺炎

目前国际上屡有报道补碘导致的甲状腺炎发病率和高碘地区自身免疫性甲状腺炎发病率增加。有学者对波兰甲状腺疾病诊所 14 年间共 35 000 例甲状腺细针穿刺患者统计研究后发现，1992 年实行 USI 后自身免疫甲状腺炎的发病率由 1.5% 上升至 5.7%。郭晓尉等研究显示，补碘可以诱发缺碘机体免疫反应，使免疫功能增强存在产生自身抗体的倾向，导致甲状腺自身抗体增高、检出率增加，而易于产生亚临床性自身免疫性甲状腺疾病。滕卫平的 5 年前瞻性流行病学调查更明确地证实，碘超足量和碘过量可以导致自身免疫甲状腺炎发病率增加，碘超足量和碘过量地区自身免疫甲状腺炎的发病率呈现 4.4 倍和 5.5 倍增高；不仅如此，碘超足量和碘过量还会促进自身免疫甲状腺炎的患者发生甲减。另一项临床流行病学调查在国际上也首次证实碘摄入量增加与产后甲状腺炎的患病率增加显著相关，碘充足组和碘过量组的产后甲状腺炎患病率分别为碘缺乏组的 1.6 倍和 2.6 倍。

7. 碘与甲状腺肿瘤

甲状腺肿瘤是一种常见的内分泌肿瘤，临床甲状腺癌的年发病率为（4～

10)/10 万。滕卫平等研究发现，在低碘和碘超足量地区，甲状腺癌的发生率几乎为 0，而水源性高碘地区甲状腺癌的发病率高达 19.37/10 万，显著高于甲状腺癌的国际发病率水平，而且全部病例都是乳头状甲状腺癌。对甲状腺癌组织学和碘摄入相关性的研究表明，乳头状癌与滤泡状癌的比例随当地摄碘量的减少而降低，对同一地区补碘后乳头状癌与滤泡状癌相比发病率明显增加。因此，高碘摄入可能与甲状腺癌的发生及组织学分类有关。

从分子生物学角度来说，碘能通过调控促分裂原活化蛋白激酶（MAPK）的信号转导通路，调节肿瘤抑制因子 p53、p21 和凋亡抑制基因 Bcl-xL 的表达，从而与甲状腺癌发病及进展密切相关，但具体机制仍不清楚。

8. 我国居民的碘营养现状

我国从 1996 年起实行全民食盐加碘法规。我国碘盐含量标准（国标 GB5461-1992）为加工 50mg/kg，出厂不低于 40mg/kg，销售不低于 30mg/kg，用户不低于 20mg/kg。1997 年国家级检测结果显示，我国居民平均 MUI、家庭碘盐中位数、学龄儿童 MUI 等指标均明显上升（表 4）。仅从食盐一个渠道，1999 年我国居民平均每天每人摄入碘即达到 423μg（按每天每人食用 10g 食盐计算）。根据前述的 WHO 和 ICCIDD2001 年公布的对碘过量的定义，我国居民 1997 年和 1999 年的碘摄入量都已经达到碘过量的标准。

表 4　我国实行 USI 前后国家级检测结果

时间	家庭合格食盐使用率（%）	家庭食盐含碘量中位数（mg/kg）	学龄儿童 MUI（μg/L）	MUI<100μg/L 的省份数	甲状腺肿患病率（%）	
					触诊	B 超
实行 USI 前						
1995 年	39.9	16.2	164.8	3	20.4	/
实行 USI 后						
1997 年	81.1	37.0	330.2	1	10.9	9.6
1999 年	88.9	42.3	306.0	1	8.8	8.0

碘缺乏程度、补碘剂量、补碘速度、碘的剂型等及碘如何导致甲亢、甲减、自身免疫性甲状腺炎和甲状腺肿瘤尤其是甲状腺癌的机制至今还不清楚，值得我们去进一步探索研究。碘摄入量与甲状腺疾病患病率之间呈典型的“U”形曲线关系。如何调整碘摄入量在一个合适的剂量范围，使甲状腺疾病的发生率处于“U”形曲线的底部，是一个重大的课题。

参 考 文 献

陈祖培，阎玉芹，舒延清，等.2001.对我国全民食盐加碘后人群的碘摄入量和安全量的分析.中

国地方学杂志,16:185～186

郭晓尉,骆效宏,王秀红.2002.补碘对缺碘集体甲状腺自身免疫的影响.中华内分泌代谢杂志,18:349～355

李丹,李晨阳,滕卫平.2003.不同碘摄入量地区妇女产后甲状腺炎患病情况的调查.中华妇产科杂志,38:216～225

滕晓春,滕卫平.2007.碘过量与甲状腺疾病.使用医学临床杂志,4:5～7

Liu XH, Chen GG, Vlantis AC, et al. 2010. Iodine induces apoptosis via regulating MAPKs-related p53, p21, and Bcl-xL in thyroid cancer cells. Molecular and Cellular Endocrinology, 320: 128～135

Slowinska-klencka D, Klencki M, Sporny S, et al. 2002. Fine-needle aspiration biopsy of the thyroid in an area of endemic goiter: influence of restored sufficient iodine supplementation on the clinical significance of cytological resulte. Euro J Endocrinol, 146: 19～26

Teng WP, Shan ZY, Teng XC, et al. 2006. Effect of iodine intake on thyroid diseases in China. The New England Journal of Medicine, 354: 2783～2793

Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, et al. 1998. Williams Textbook of Endocrinology. 9th ed. Philadephia: Saunders, 9: 392

撰稿人:李成江　冯　烨

浙江大学医学院附属第一医院

以银屑病为模型，探索表皮细胞增殖的奥秘

Discovery the Mysteries of Epidermal Cell Proliferation with Psoriasis as a Model

皮肤是人体最大的器官，发挥以屏障作用为主的复杂功能，对维持人体内环境稳定非常重要。表皮为复层鳞状上皮（stratified squamous epithelium），主要是由上皮细胞（epithelial cell）和树突细胞（dendritic cell）组成，其中前者占95%。上皮细胞的基本生物学作用是形成角蛋白，故又称角质形成细胞（keratinocyte），其发生和分化最终阶段是形成含有角蛋白的角质细胞，后者是完成表皮屏障功能的主要有形成分。

角质形成细胞属于常变细胞，可不断进行增殖、分化和更新，这与其发挥正常生理功能是相适应的。角质形成细胞由基底层分化成熟为角质层直至脱落的过程称为表皮更替（epidermal turnover），它受到多个基因和环境因素的控制和影响，是一个遵循“干细胞→短暂增殖细胞→终末分化细胞”细胞动力学模式的渐进过程和复杂性状。当个体存在先天性基因结构功能异常或受到某些后天性环境因素刺激后，正常表皮更替过程可被打破，出现异常增殖和分化，后者正是很多皮肤疾病发生的病理学基础。研究角质形成细胞生理性增殖及病理性增殖，对于阐明和理解皮肤功能及相关疾病的发病机制，均具有重要意义。

很多疾病（如各种角化性皮肤病和皮肤肿瘤等）的发生与角质形成细胞的病理性增殖有关，引起病理性增殖的因素包括各种外因（如外伤、紫外线、化学物质、感染等）和内因（如体内炎症细胞、炎症因子及遗传物质变异等）。既往曾经从多个层面和角度对这些疾病开展了相关研究，但越来越多的研究证据显示，对于各种持久性角质形成细胞病理性增殖而言，遗传因素均发挥了重要的核心作用，因此有必要对某些具备典型表型的模型疾病开展系统研究。

银屑病（psoriasis）是一种慢性、复发性、炎症性皮肤病。据估计，我国患者总数达数百万，给患者、家庭及社会带来严重健康问题。目前认为银屑病是遗传因素与环境因素相互作用引起的复杂疾病（complex disease），通过免疫介导等共同通路，最后引起角质形成细胞发生病理性增殖，导致表皮更替时间显著缩短（由正常的28～56天缩短为4～6天），那么究竟是什么原因导致这种变化发生的呢？这正是多年来国内外专家孜孜不倦探讨的重要科学问题。

从外因层面入手，人们发现6%的银屑病患者有咽喉感染史，儿童患者更是

高达 10% ～20% ，且青霉素等抗生素治疗常有较好疗效，因此提出感染是促发或加重银屑病的主要因素；统计发现 18.6% 的患者发病由神经精神因素激发，神经肽（如 SP、CGRP、血管活性肠肽等）可能是银屑病神经源性炎症中的重要介质；国内大样本研究显示，吸烟与潮湿的居住环境是银屑病最值得关注的两种发病或复发因素。

从患者免疫异常层面入手，研究发现真皮 T 细胞浸润是本病重要的组织病理学特征，表明免疫系统涉及本病的发生和发展，推测皮损中活化 T 细胞释放的细胞因子（IL-1、6、8 和 IFN-γ 等）刺激角质形成细胞发生病理性增殖，此外，朗格汉斯细胞在银屑病的发生发展中也起着重要作用；从患者细胞因子或炎症介质角度来看，有异常多的证据得到发表，但其指向的细胞因子或炎症介质均不明确，有些甚至互相矛盾，表明这些细胞因子或炎症介质的异常可能为某些原因导致的“继发性结果”而并非真正的“始发性原因”。

近二十年来，特别是人类基因组计划实施后至今，研究工作投入了更多的人力物力，用于寻找银屑病发病中的遗传学因素。利用群体遗传学研究、连锁分析、关联分析等技术平台和研究路线，目前已经证实了银屑病的多基因遗传模式，并先后发现很多银屑病易感基因，但多数复杂疾病的研究结果变异较大，后者进一步证实了银屑病的种族差异性和表型复杂性。

2008 年开始，国际上开始应用全基因组关联分析（genome wide association studies，GWAS）研究银屑病。GWAS 是一种在全基因组范围内对常见遗传变异（单核苷酸多态性和拷贝数变异）进行总体关联分析的方法，能在一定精度内（依赖于纳入研究的 SNP 数量）对疾病进行轮廓性概览，适用于复杂疾病的研究。2009 年先后有若干个国际团队采用 GWAS 平台，在不同种族人群中均独立发现了晚期角质化包膜（late cornified envelope，LCE）基因家族的变异，这一方面证实了银屑病存在主效基因，另一方面也验证了 GWAS 平台对于研究多基因病的有效性。

LCE 基因家族位于 1q21 上，其表达产物直接作用于角质形成细胞的增殖过程，可能是导致银屑病发病的真正“始发性原因”之一，将来需要对 LCE 基因家族开展更为深入的研究，如何阐明其功能模式，以及寻找调节和干预病理性功能的手段方法，将是研究的难点。目前虽然已经有了一些针对某些基因的有效靶向治疗手段，但可以预知，针对 LCE 基因家族等“始发性原因”的靶向性治疗，可能是将来银屑病治疗学上的发展方向。对 LCE 基因家族认识的不断深化，将不仅有利于确定新的药物靶位，而且对治疗的个体化也有重要意义。

利用 GWAS 技术平台以及将来不断涌现的新型技术路线和策略，将会有更多的银屑病易感基因被发现。可以预见，通过对银屑病的系统研究，不仅能加深对银屑病本身的理解和认识，同时也能对皮肤角质形成细胞生理性增殖过程以及

病理性增殖相关性疾病积累大量的理论基础和实验数据。相信随着对银屑病的进一步深入研究，人们对于皮肤角化奥秘的了解将会不断达到新的深度和广度。

参 考 文 献

Backendorf C, Hohl D.1992. A common origin for cornified envelope proteins? Nat Genet, 2: 91

Bhalerao J, Bowcock AM.1998. The genetics of psoriasis: a complex disorder of the skin and immune system. Hum Mol Genet, 7: 1537～1545

Bowcock AM, Krueger JG.2005. Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. Nat Rev Immunol, 5: 699～711

Fan X 2008. Fine mapping of the psoriasis susceptibility locus PSORS1 supports HLA-C as the susceptibility gene in the Han Chinese population. PLoS Genet, 4: e1000038

Price AL.2006. Principal components analysis corrects for stratification in genomewide association studies. Nat Genet, 38: 904～909

Zhang XJ.2007. Polymorphisms in interleukin-15 gene on chromosome 4q31.2 are associated with psoriasis vulgaris in Chinese population. J Invest Dermatol, 127: 2544～2551

Zhang X, Wang H, Te-Shao H, et al.2002. The genetic epidemiology of psoriasis vulgaris in Chinese Han. Int J Dermatol, 41: 663～669

Zhang XJ, Huang W, Yang S, et al.2009. Psoriasis genome-wide association study identifies susceptibility variants within LCE gene cluster at 1q21. Nat Genet, 41: 205～210

撰稿人：张学军　崔　勇

安徽医科大学第一附属医院

皮肤抗病毒感染免疫的局限性

Incompetence of Skin Immunity Against Virus Infection

作为人体的外在器官，皮肤易受到各种理化因素及微生物的侵袭，发生不同的临床疾病。病毒感染性皮肤病是常见的皮肤病之一，其中人乳头状瘤病毒（human papillomavirus，HPV）感染引起的皮肤病备受关注。HPV 属乳多空病毒科多瘤病毒亚科，为球形无包膜的双链 DNA 病毒，直径为 52～55nm。病毒基因组为 7.8～8.0kb。该病毒不能在体外培养繁殖。现已鉴定出 120 余种 HPV 基因型，型间 DNA 的同源性低于 50%。大部分型别的 HPV 引起上皮细胞的良性增生反应（如 HPV1、2、3、4、6、11 等）；较少的高危 HPV 型别（如 HPV16、18、31、33 等）可引起上皮细胞的恶性转化。HPV 引起皮肤或黏膜上皮细胞发生良性增殖反应，导致乳头状瘤或疣状损害，也称为疣，如临床常见的寻常疣、扁平疣、跖疣、喉或结膜乳头瘤、尖锐湿疣等。有报道 HPV-16、18 在宫颈癌的检出率高达 99.7%；现已证实，高危型别的 HPV 是宫颈癌的主要元凶。发现 HPV 是宫颈癌致病因素的德国科学家 Harald zur Hausen 由此获得 2008 年诺贝尔生理学/医学奖。其后的大量研究发现，HPV 感染与皮肤鳞状细胞癌、直肠癌、肺癌、喉癌、膀胱癌、鼻咽癌、口腔鳞癌、食管癌等相关。

HPV 感染上皮细胞后，会出现多种可能的临床情况：①亚临床或潜伏感染，感染后无明显症状；②各种疣，如寻常疣、扁平疣等；③可疑的与 HPV 感染有关皮肤病，如脂溢性角化症；④癌前病变，如外阴上皮内瘤变；⑤上皮恶性肿瘤，如皮肤鳞癌；⑥其他。一般情况下，HPV 感染引起的良性上皮增生肿物常可自行消退。以寻常疣为例，大约 2/3 的病例即使未经治疗，两三年时间疣体常可自愈。但也有部分患者疣体可长期不退或病毒持续存在。长期不愈的患者中，如果病毒 DNA 整合入机体细胞的基因组，则可能诱发细胞恶性转化。

现普遍认为，机体清除 HPV 感染是通过细胞免疫反应实现的。在免疫触发阶段，表皮内的朗格汉斯细胞（Langerhans cell，LC）捕获、处理并将 HPV 的抗原成分提呈给病毒抗原特异的淋巴细胞；在免疫效应阶段，杀伤性 T 细胞、自然杀伤细胞等参与了病毒感染细胞的清除。LC 完成提呈抗原、引发免疫应答反应的活动受多种细胞因子及其受体（包括趋化因子及其受体）、人类白细胞抗原等多种因素的影响。LC 是德国医学生朗格汉斯（1847～1888）首次在皮肤表皮层中发现的树突形状细胞，为纪念他的发现，后人将这些树突形状细胞命名为

朗格汉斯细胞。以后的研究发现 LC 有摄取、处理和提呈抗原的功能，在皮肤免疫应答反应中发挥重要作用。有人形象地比喻，LC 是皮肤免疫的哨兵，它们能迅速发现、报告敌情，引导机体的守卫者（其他免疫细胞）合围并消灭入侵者。

既然机体有免疫系统抵御 HPV 感染，为什么会出现 HPV 感染后皮损经久不愈，甚至恶性转化的情况？有多种免疫细胞和分子参与抗 HPV 感染免疫。其中的任一环节缺陷或功能不足都可能影响建立适宜的免疫应答反应。如 LC 能否有效提呈 HPV 抗原？主要组织相容性抗原的多态性是否使机体对 HPV 易感或影响抗 HPV 免疫，免疫细胞相关分子或可溶性分子是否积极参与，辅助性 T 细胞的激活或调节作用是否适宜，效应性淋巴细胞功能状态如何，等等。即使机体免疫系统的所有组分都能正常发挥作用，进化中的 HPV 本身为了逃避机体免疫系统的清除，也会通过合成一些分子抵御免疫系统的清除，其机制包括免疫逃逸（immune evasion）、免疫耐受（immune tolerance），甚至免疫颠覆（immune subversion）等。以 HPV 和 LC 之间的关系为例：已知 HPV 不能感染 LC 细胞，也不能使被感染角质形成细胞溶解，故 LC 不易吞噬病毒并提呈病毒抗原。HPV 通过受损的表皮感染未分化的基底细胞，并伴随上皮细胞的增殖分化而完成复制周期。HPV 在低分化的表皮层主要在角质形成细胞核内表达早期蛋白，不易被免疫细胞识别并捕获；晚期合成的病毒颗粒虽具有很强的免疫原性，但成熟的病毒颗粒多在表皮的上部形成，此处 LC 密度很低，也不易获取病毒抗原。还有研究发现，即使 LC 捕获了病毒抗原，HPV 还能通过活化 LC 的磷酸肌醇 3 激酶（phosphoinositide 3-kinase）而逃避免疫识别；通过减少巨噬细胞炎症蛋白 3α（macrophage inflammatory protein- 3 alpha）而抑制 LC 的功能成熟。HPV 和 LC 之间如同展开了一场“猫捉老鼠”的游戏。如果我们能够利用一些理化或生物因素“帮助”LC 积极发挥功能，有可能形成一种能使机体清除 HPV 感染的好方法。有研究发现，皮肤外用咪喹莫特能够诱导角质形成细胞产生多种有利于抗病毒的细胞因子；外用该药物还能活化 LC，增强其向局部淋巴结的游走能力。我们最近发现，适宜范围内的温热条件能够促进 LC 的游走和成熟，在 HPV 感染皮肤内体现得更明显；利用温热方法不仅能使患者的靶疣消退，还能使未接受治疗的疣体相继消除，提示温热有促进机体抗病毒免疫应答反应的作用。当然，我们应清醒地认识到，影响机体抗 HPV 感染免疫的因素和环节有很多；众多的持续感染状态者中可能有不同的因素在发挥作用。

皮肤是机体的窗口器官，开展皮肤病毒持续感染的研究有取材容易、观察方便的优势。如能在皮肤病毒持续感染的机制及防治方面取得突破，还将会为其他内脏器官持续病毒感染（如乙型肝炎）的治疗提供借鉴。

参考文献

Bos JD. 2004. Skin Immune System: Cutaneous Immunology and Clinical Immunodermatology. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press

Fausch SC, Fahey LM, Da Silva DM, et al. 2005. Human papillomavirus can escape immune recognition through Langerhans cell phosphoinositide 3-kinase activation. J Immunol, 174: 7172

Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P. 1999. Natural adjuvants: endogeneous activators of dendritic cells. Nat Med, 5: 1249

Gao XH, Gao D, Sun XP, et al. 2009. Non-ablative controlled local hyperthermia for common warts. Chin Med J, 122: 2061

Gross G, von Krogh G. 1997. Human Papillomavirus Infections in Dermato-Venereology. Boca Raton: CRC Press

Huo W, Gao XH, Sun XP, et al. 2010. Local hyperthermia at 44 degrees C for the treatment of plantar warts: a randomized, patient-blinded, placebo-controlled trial. J Infect Dis, 201: 1169

Li X, Gao XH, Jin L, et al. 2009. Local hyperthermia could induce migrational maturation of Langerhans cells in condyloma acuminatum. J Dermatol Sci, 54: 121

Offringa R, de Jong A, Toes RE, et al. 2003. Interplay between human papillomavirus and dendritic cells. Curr Top Microbiol Immunol, 276: 215

Tindle RW. 2001. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. Nature Reviews Cancer, 2: 1～7

撰稿人:陈洪铎　高兴华
中国医科大学附属第一医院

侵袭性真菌感染的早期诊断

Early Diagnosis of Invasive Fungal Infections

真菌（fungus）是广泛分布于自然界的真核生物，绝大多数对人类有利，也有少数真菌可感染人类导致严重疾病。近三十年来，由于造血干细胞移植（hematopoietic stem cell transplantation，HSCT）、实体器官移植、各种导管介入和留置技术的广泛开展，高强度免疫抑制剂和大剂量化疗药物的广泛应用及HIV在全球的持续蔓延，侵袭性真菌感染（invasive fungal infection，IFI）的发病率及死亡率在全球范围内迅速持续上升，严重威胁着人类健康，给国家带来沉重的额外医疗经济负担。我国相关流行病学研究发现，住院患者侵袭性真菌感染发病率为4.4%，已成为我国医院感染第二位的重要组成部分（约占24.1%），其中对我国人民生命健康危害最严重的侵袭性真菌感染致病真菌有白念珠菌、新生隐球菌、烟曲霉等，其导致的侵袭性真菌感染若不及时正规抗真菌治疗，隐球菌性脑膜脑炎一年内病死率达86%以上，侵袭性曲霉病的病死率高达90%，念珠菌病的病死率亦达40%以上；而在艾滋病患者中，约有33%的患者死于并发侵袭性真菌感染。

侵袭性真菌感染起病隐匿，预后凶险，对其早期准确诊断是影响治疗及预后的关键，但目前国内外侵袭性真菌感染实验室诊断的现状远不能满足需要，特别是早期特异性诊断一直存在困难，使很多患者病情延误导致治疗失败甚至失去治疗的机会。当面对可疑侵袭性真菌感染时，临床医生常被迫对患者进行预防性或经验性抗真菌治疗，导致患者肝、肾功能等严重损伤及耐药菌株出现，如近年来白念珠菌对氟康唑耐药性明显增多。因此，如何提高侵袭性真菌感染的早期诊断水平已成为国内外医学真菌研究者共同关心的热点问题，也是临床侵袭性真菌感染诊治现实的重大需求。

目前，直接涂片染色镜检、培养、组织病理学诊断等仍是侵袭性真菌感染诊断的金标准，但费时、灵敏度差，具有创伤性，对操作人员的经验技术要求高，阴性结果不能排除诊断。近年来，侵袭性真菌感染早期诊断的进展主要集中在对真菌抗原的直接检测（如半乳甘露聚糖及β葡聚糖）、念珠菌显色培养基等快速培养鉴定法、微生物生化自动分析系统（VITEK2、MicroScan等）及针对临床标本或培养阳性标本直接PCR扩增产物DNA测序等。但是，针对真菌抗原的直接检测如G实验及GM实验利用免疫学原理的基本属性使其假阳性与假阴性

报告屡见不鲜，尤其是对可疑的 AIDS 患者复发真菌感染，由于 AIDS 患者不能消除真菌抗原，故即使在如烟曲霉等真菌非致病态，抗原的检测也为阳性，成为困扰当前临床侵袭性真菌感染诊治的一大难题。商品化的真菌鉴定试剂盒，如科玛嘉念珠菌显色培养基及法国 Biomerieux 公司的 API 20C 等虽可鉴定多种酵母菌，但是对于丝状真菌，如曲霉菌、青霉菌、镰刀霉菌、孢子丝菌等则不能进行鉴定。近年来，以 PCR 技术为代表的分子生物学技术的飞速发展似乎为快速、敏感、特异诊断侵袭性真菌感染如曲霉菌病等开辟了一条新的途径，目前国内外已将真菌通用及种属特异性引物初步应用于 PCR 技术对系统性念珠菌病、隐球菌病和曲霉菌病的早期特异诊断，包括巢式 PCR、RT-PCR 等方法的应用，对于提高侵袭性真菌感染的诊断水平有十分重要的意义，但胃肠道死亡细胞的污染可能导致 PCR 假阳性，对一些体液样本 PCR 难以达到如同培养样本的敏感性。而rDNA序列分析及 PCR 指纹技术（PCR fingerprint）等，虽近些年来已经广泛应用于真菌分子流行病学研究，但其测试成本高，需要设备多，目前尚无比较成熟的商品化系统能够全面完成检测工作。目前还没有美国食品药品监督管理局批准的应用于临床的 PCR 真菌诊断方法。因此，如何对血液、尿液和脑脊液等临床标本的选择和处理及 PCR 检测与结果分析等诸多环节进行标准化和规范化质控，以达到侵袭性真菌感染临床诊治需求的检测灵敏度和特异性，仍是任重道远。

实际上，由于自然界中遍布曲霉菌等真菌的孢子，而且某些真菌如曲霉菌等可以在正常人及免疫抑制患者体内如呼吸道等组织中定植而并不处于致病状态。因此，如何早期、特异地区分高危人群人体组织中处于定植及致病态的真菌是侵袭性真菌感染早期特异性诊断的真正难点。笔者认为，传统真菌检验方法及现有的分子生物学技术对于解决该难题并无优势，而利用蛋白质组学及代谢组学技术分析侵袭性致病真菌在人体中定植态与致病态表达蛋白产物或代谢产物的差异，发现真菌由定植态向侵袭态转变的规律性的分子标志物，再利用免疫学原理开发临床实用的诊断试剂盒可能是解决当前侵袭性真菌感染早期诊断困境的理想途径。

总之，近年来侵袭性真菌感染的发病率呈显著上升趋势，而临床真菌感染实验室诊断的现状却远不能满足需要，而如何提高侵袭性真菌感染的诊断水平是国内外当前该领域研究的热点问题。展望未来，随着蛋白质组学等组学技术的快速发展，只要我们不懈努力，坚持科研密切结合临床，扎实做好常规检验并积极研究真菌检验的新方法，侵袭性真菌感染早期诊断的难题就一定会得到圆满解决。

参考文献

冯文莉，杨静，贾晓强，等.2009.侵袭性真菌医院内感染的流行病学调查.中华流行病学杂

志,30(10)

廖万清,吴绍熙.2006.病原真菌生物学研究与应用.北京:化学工业出版社.56~113

吴文娟,汤一苇.2008.医学病原真菌的研究现状和发展方向.微生物与感染,(4):246~248

Barnes RA. 2008.Early diagnosis of fungal infection in immunocompromised patients. J Antimicrob Chemother,61(Suppl 1):i3~i6

Corinna Hahn-Ast, Axel Glasmacher, Sara Mückter,et al.2010. Overall survival and fungal infection-related mortality in patients with invasive fungal infection and neutropenia after myelo-suppressive chemotherapy in a tertiary care centre from 1995 to 2006. J Antimicrob Chemother,65:761~768

Einsele H,Loeffter J. 2008. Contribution of new diagnostic approaches to antifungal treatment plants in high-risk heamatology patients. Clin Microbiol Infect,14(4):37~45

Mengoli C, Cruciani M,Barnes RA,et al. 2009. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis:systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis,9:89~96

Pfaller MA, Diekema DJ.2010. Epidemiology of invasive mycoses in North America. Crit Rev Microbiol,36(1):1~5

Pfaller MA, Pappas PG, Wingard JR.2006. Invasive fungal pathogens current epidemiological trends. Clinical Infect Diseases,43:S3~14

撰稿人:廖万清
第二军医大学附属长征医院

帕金森病的悬案

Unsettled Question of Parkinson's Disease

帕金森病（PD）分为散发性帕金森病和家族遗传性帕金森病。前者占80%以上，后者占5%～15%。Carlsson等（1959）证明多巴胺及其神经元主要集中在脑内纹状体，且与运动调节有关。其后病理解剖证实PD患者黑质纹状体的变性和萎缩，多巴胺能神经元大量脱失，该区*L*-Dopa的含量少于80%以上产生帕金森临床表现。1964年后发现黎豆提取的*L*-Dopa用于帕金森病患者可明显改善少动、震颤等症状，人们以为找到了“病因”，为此兴奋。

帕金森病中黑质纹状体发生病损，其中多巴胺神经元的不断死亡和脱失，是疾病的结果而不是疾病的病因。因为人们根据上述的发现，给PD患者补充*L*-Dopa，给予单胺氧化酶抑制剂和儿茶酚氧位甲基转移酶（COMT）减少*L*-Dopa降解，再用类似Dopa作用的多巴胺受体激动剂等方法治疗PD患者，这些方法只能改善症状，不能治愈疾病。若干年后药物可失效，病情仍然进展。此外，有人将胎儿黑质多巴胺细胞移入PD患者病损区，仅能维持一年左右的疗效，移植的黑质细胞又死亡了。

半个世纪以来人们进行了大量探索，提出了众多学说，发表了堆积如山的论文，然而没有一个人能总结出单一病因，故对帕金森病的认识和研究进入了围绕黑质纹状体多巴胺神经元损害的怪圈。尽管有各种设想和实验想“解开”此谜，然而没有取得进展。帕金森病的治疗仍停留在多巴胺能系统的补偿、调节失衡的水平。

为什么黑质纹状体的多巴胺能变性早于脑内其他细胞的变性？为什么广大人群中只选择“特定”少数人患帕金森病？造成散发性和遗传性帕金森病共同发病的原因是什么？这些问题至今悬而未决。

Kumar等（2004）提出外界环境和患者体质的内在因素相互作用失调的发病概念，然而这也是一种模糊的观念。

环境因素的流行病研究和实验研究发现农药是危险因素，除草剂（百草枯）、杀虫剂（鱼藤酮）可用于造帕金森病模型。服百草枯自杀未遂的人，后遗帕金森样表现。可是在广大人群和帕金森病患者血和组织中没有发现这些毒物。所以至今未找到造成帕金森病的自然界中存在的致病毒物。

目前认为帕金森病属于α-突触核蛋白（α-synuclein）病。这也仅属于一种学说

而已。α-突触核蛋白突变可能是部分家族性帕金森病患者的病因。此后，它被证实是PD病理中Lewy小体中的主要蛋白组分。Braak（2003）根据α-突触核蛋白在脑中的分布和播散趋势，总结出帕金森病病理分级。然而这些α-突触核蛋白的研究进展尚未对帕金森病的临床诊断和治疗产生实质影响。而且至今我们甚至还不了解其确切的生理功能及其在帕金森病中的致病机制，也不清楚是什么原因导致其在帕金森病中黑质等区异常聚集成为多巴胺能神经毒性，也不清楚α-突触核蛋白通过何种途径可以阻断或去除这种神经毒性。

有人从基因角度找寻帕金森病的病因和发病机制，有以下众多说法，但也未找到真正病因来回答上述三个问题。

家族遗传性患者中发现PARK基因总共11个，但在散发病例中未测出上述基因。关于11个PARK基因在家族遗传发病中的作用，有研究发现PARK1基因突变引起α-突触核蛋白结构改变，PARK2功能丧失与UCH-L_1活性降低相关，也促使α-突触核蛋白聚集于Lewy体，据此提出了泛素-蛋白酶体降解系统功能异常的发病学说。

目前确定了许多Parkin的底物，包括CDCrel-l、synphilin-1、*O*-glyosylated、α-突触核蛋白、PAEL-R和p38。这些底物有潜在的毒性。许多实验中发现Parkin有控制导致神经元死亡通路的作用。

Parkin的丧失能影响细胞内线粒体功能的损害，如损害复合物Ⅰ和Ⅳ，减少细胞的抗氧化能力，增加了线粒体的氧等自由基的损害。

在晚发性PD患者中发现NR4AP（Nurr1）基因的突变，Nurr1在多巴胺神经元存活中起重要作用，敲除Nurr1的小鼠会造成多巴胺神经元缺失。

近年发现来自PARK7的基因产物DJ-1在星形细胞表达很多。DJ-1的功能并不十分清楚，可能会减少氧化应激、调节细胞的凋亡。

近年发现LRRK2是一种复合胞液蛋白（complex cytosolic protein），LRRK2突变增加氧化磷酸化过程，细胞内LRRK2突变加速导致包涵体形成和促使细胞变性。

由E3连接酶（E3 ligase）活性丧失引起的Parkin突变，导致散发性PD中一氧化氮对细胞的损害。

近来也有人从黑质多巴胺细胞所处的周围环境角度去研究PD的黑质神经元死亡的原因。尽管有如下的看法，但也未解决上述三个问题。

PD患者黑质中存在细胞激动素和胶质细胞，起相辅相成的作用。胶质细胞增生产生胶质衍生神经营养因子等物质，营养和保护神经元。然而细胞激活素（IL-1β、IL-6、TNF-6和IFN-γ）也促使i-nos和cox-1、cox-2及前列腺素2造成黑质炎性过程，反而损害黑质细胞。

此外，帕金森病患者脑内除多巴胺能系统损害外，其他脑区有去甲肾上腺

素、5-HT、乙酰胆碱、GABA、谷氨酸及其他神经肽等系统的异常。脑内谷氨酸受体 NMDA 的抑制可治疗帕金森病的异动症。PD 脑内广泛生化紊乱是如何产生的也不清楚。

总之，帕金森病的唯一病因是什么，如何去除病因、治愈帕金森病，至今仍未解决。

参 考 文 献

张克忠，王坚，蒋雨平.2005.Lcatacystin 对酪氨酸羟化酶基因和蛋白表达成的影响.中国临床神经科学,13(2):144～147

Ardley HC, Scott GB, Rose SA, et al.2004.UCH-1 aggresome formation in response to orotea-some impairment indicates a rloe in inclusion formation in Parkinson's disease. J Neurochem, 90:264～268

Bisaglia M, Mammi S, Bubacco L.2009. Structural insights on physiological functions and path-ological effects of alpha-synuclein. FASEB, 23:329～340

Di FA, Rohe CF, Ferrira J, et al.2005. Afrequent LRRK2 gene mutation associaten with auteso-mal dominant Parkinson's disease. Lancet, 365:412～415

Fahn S, Jankovic J. 2007. Principles and Practice of Movment Disease. London: Churchill Livin-stone, 105～112

Hoglinger GU, Carrard G, Michel PP, et al.2003.Dysfunction of mitochondrial complex 1 and the proteasome: interactions between two biochemical deficits in a cellular model of Parkinson's disease. J Neurochem, 86:1297～1307

Kordower JH, Kanaan NM, Chu Y, et al.2006. Failure of proteasome inhibitor administration to provide a midel of Parkinson's disease in rats and monkeys. Ann Neurol, 60(2):264～268

Lesage S, lbansz P, Lohmann E, et al.2005. G20195 LRRK2 mutation in french and North Afri-can families with Parkinson's disease. Ann Neurol, 58:784～787

Uversky VN.2008. Alpha-synuclein misfolding and neurodegenerative diseases. Current Protein & Peptide Science, 9:507～540

撰稿人:蒋雨平　王　坚

复旦大学附属华山医院

脑卒中患者功能恢复的新希望

New Hope of Functional Recover for Ischemia Stroke

脑卒中已成为中国人群疾病死亡的首要原因，其中70%为脑缺血性疾患，主要由颅内外大动脉发生闭塞或栓塞，致使动脉供血区域中脑组织血管神经单元的损害，发生神经元的坏死与凋亡、神经胶质细胞功能异常，以及血管内皮细胞损伤，最终导致患者发生神经功能的缺损、生活能力的下降、致残，严重影响患者的家庭及社会生活。WHO（世界卫生组织）发现全球57个国家中死于脑血管病者占11.3%，其中40个国家脑血管病占死因前三位，平均发病率（150～200）/10万人、患病率（500～600）/10万人。全球按50亿人口算，有2500万～3000万患者，其中缺血性脑血管病占60%～80%，具有高发病率、高致残率及高复发率的特点。存活者中约3/4有不同程度的劳动能力丧失，其中重度致残者约占40%以上。我国标化发病率（120～180）/10万、患病率429/10万人，有500万～600万存活患者；脑血管病每年药费支出在118亿元人民币以上，约2/3的脑血管病患者首次发病在60岁以上，对60岁以上老人的健康构成极大威胁。随着世界人口老龄化趋势，我国老龄化发展速度很快，65岁以上已占总人口的10%以上，到2045年达到高峰，平均每4个人中就有1位老年人。因此，不难看出，一个日益庞大的老年人群将伴随而至一个日益严峻的脑血管病的挑战。它严重影响着老年人口的健康状况、生活质量，同时也给我们尚不富裕的国家和人民、有限的健康资源带来沉重的负担。

在卒中发生后的急性期，除了支持性治疗以外，临床有效治疗脑梗死的手段极其贫乏，唯一被证实有效的治疗是重组纤溶酶原激活物（rtPA）静脉溶栓治疗。NINDS试验证实在3小时以内静脉注射rtPA（0.9mg/kg）可以大幅提高脑梗死患者3个月后良好预后（mRS值0～1）的比例（治疗组达39%，是对照组26%的1.6倍，$P<0.001$），虽然症状性颅内出血（sICH）治疗组（6.4%）比对照组（0.6%）明显增多（$P<0.001$），3个月后死亡率两组无差异。然而，因为时间窗狭小，即使在美国，也仅有1%左右的患者能受益于溶栓治疗。经过各国科学家的努力，时隔13年后，ECASS Ⅲ试验终于将rtPA治疗的时间窗延长到4.5小时。问题是，即使如此，也仅有1/3的脑梗死患者能恢复生活能力！

除了溶栓治疗外，科学家们深入研究的众多卒中损伤靶点可能会减轻神经与血管的损伤，但一旦引入临床，许多实验中有效的治疗方法均宣告失败，究其原

因，可能是卒中的发生本来就是多因素共同作用的结果，因此单一治疗难以奏效。由于脑缺血是颅内外大动脉发生闭塞或栓塞，致使动脉供血区域中脑组织血管神经单元的损害，从而同时导致神经元的坏死与凋亡、神经胶质细胞功能异常及血管内皮细胞损伤等三个方面损害。如何减轻血管神经单元的损害、促进重构神经组织、重建脑组织循环是神经功能恢复的根本。

目前，针对该科学问题的研究聚焦在血管（angiogenesis）与神经新生（neurogenesis），内源性神经干细胞的存在已经打破“成熟神经细胞不能再生的旧观念”，大量通过定向分化导入损伤组织的干细胞研究给临床治疗带来极大的希望。内源性干细胞主要来自室管膜下区（SVZ），该区的神经干细胞把血管作为支架迁移到梗死区。脑缺血时，内皮细胞激活诱导神经干细胞分化为神经元，而神经祖细胞也同时促进血管发生；VEGF 则是血管再生与神经再生相互作用的重要桥梁。外源性的干细胞主要来源于胚胎和骨髓等，通过静脉将人骨髓间质细胞（hMSC，人间充质干细胞）移植治疗 MCAO 大鼠，在梗死灶边缘，形态学和三维像提示 hMSC 促进血管和毛细管样微管的增殖，hMSC 促进血管发生的机制与上调 VEGF（血管内皮生长因子）和 VEGF 受体 2（VEGFR2）有关。以上实验结果表明，内源性或外源性神经干细胞既可以直接转化为神经细胞，又能促进损伤后血管新生。因此，作为神经再生和血管新生潜在的共同枢纽，神经干细胞治疗对于改善脑卒中受损的血管神经单元可能会有明显的作用，最终将促进神经组织的重构和重建脑循环，为重危病人康复带来一线曙光。这将是未来神经病学家和神经科学家共同研究的战略方向。

需要特别提到的是，干细胞促进血管和神经新生应用于临床仍然有很长的路要走。有研究表明，大约 80% 新增殖的内源性神经干细胞会在 6 周内死亡，仅有大约 0.2% 的细胞缺失能得以替代。而外源性干细胞移植治疗可在宿主体内存活、迁移、部分分化成神经元，但是还没有供体细胞与宿主神经网络建立有功能突触联系的确切依据。因此，无论是通过促进内源性干细胞的增殖，还是着力于研究供体细胞与宿主神经网络建立有功能突触的联系，或者是围绕着所谓的“bystander mechanism”而非“细胞替代”机制深入研究，都将为脑缺血卒中病人的预后改善提供帮助。

参考文献

Albers GW, Olivot JM. 2007. Intravenous alteplase for ischaemic stroke. Lancet, 369: 249～250

Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, et al. 2008. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute Ischemic stroke. N Engl J Med, 359(13): 1317～1329

Liu YP, Seckin H, Izci Y, et al. 2009. Neuroprotective effects of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells in transient focal cerebral ischemia in rats. Journal of Cere-

bral Blood Flow and Metabolism ,29(4):780～791

Mrtino G ,Pluchino S . 2006 .the therapeutic potential of neural stern cells . Nat Rev Neurosci ,7 : 395～406

Nadareishvili Z ,Hallenbeck J .2003 . Neuronal regeneration after stroke . N Engl J Med ,348 : 2355～2356

National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Groups (NINDS). 1995 . Tissue plasminogen activator for acute ischaemic stroke . New England Journal of Medicine ,333(24):1581～1587

撰稿人:董　强　唐宇平

复旦大学附属华山医院

艾滋病病毒潜伏感染形成机制及对策

How Is HIV-1 Latent Infection Established and How to Tackle HIV-1 Latency

1. 背景

在艾滋病病毒（HIV-1）侵染人体的急性感染期，病毒 RNA 进入大部分处于活化状态的宿主 $CD4^+$ T 细胞等后，逆转录成为双链 DNA，然后被整合至宿主基因组中形成前病毒（provirus）。前病毒持续不断地转录出编码病毒组分的 mRNA 或 mRNA 前体，直接或经适当剪切后运出细胞核，翻译成各种病毒组分蛋白，最后包装成病毒粒子，出芽释放至胞外，开始下一轮生活周期。在极少数宿主细胞中，整合后的 HIV-1 前病毒不转录或者以低于检测极限的水平进行转录，形成潜伏感染（latent infection）。这些处于潜伏状态的前病毒被称为 HIV-1 潜伏库（latent reservoir），含有 HIV-1 潜伏库的细胞被称为潜伏库细胞。潜伏的前病毒能逃避宿主免疫系统和目前所有抗病毒药物的攻击，但在停止用药等条件下，其转录可以被激活，产生有感染性的病毒粒子。

Anthony Fauci 和 Paula Pitha 等研究小组于 1987 年报道，在体外培养细胞模型中，HIV-1 病毒基因能以潜伏形式存在并被细胞因子和单纯疱疹病毒（HSV-1）等激活表达，形成有感染活性的病毒粒子。1997 年，Robert Siliciano 研究小组和 Douglas Richman 研究小组在接受高效抗逆转录病毒治疗（HAART）后血浆 HIV-1 载量低于检测极限的患者体内，首次检测到整合至宿主基因组中并具有复制能力的 HIV-1 前病毒，为 HIV-1 潜伏库的存在提供了直接证据。他们的研究表明，在每 1×10^6 个静息态（G_0 期）$CD4^+$ T 细胞中，只有 0.2～16.4 个含有整合的潜伏 HIV-1 前病毒，大部分进入静息态 $CD4^+$ T 细胞的病毒 RNA 在逆转录成为双链 DNA 后以不稳定的游离态形式存在；在整个人体中，携带整合的潜伏 HIV-1 前病毒的潜伏库细胞总量也不过在 1×10^6～1×10^7 个数量级（正常人体淋巴细胞总数为 1×10^{12} 个左右）。感染者体内潜伏库细胞数如此之少，在技术上给分离和研究 HIV-1 潜伏库带来了极大的困难。因此，研究者主要通过建立各种体外培养细胞模型来研究 HIV-1 潜伏库的形成、维持和激活等的机制。

2. 科学意义

由于潜伏库细胞在人体内自我更新的半衰期长达 44 个月，即使 HAART 能

完全阻止患者体内新 HIV-1 的产生，通过潜伏库细胞自我更新来彻底清除 HIV-1潜伏库的时间也需要超过 50 年，也就意味着患者需要终生服药。因此，HIV-1 潜伏库在患者体内的长期存在是根治艾滋病的最大障碍。深入和全面地研究 HIV-1 潜伏感染的机制，可以帮助人们了解 HIV-1 是如何寻找到宿主体内的“破口”并“藏匿”起来的，从而制定出相应的治疗措施，达到清除 HIV-1 潜伏库，最终根治艾滋病的目标。

3. 最新进展

目前普遍认为，静息态的 $CD4^+$ 初始 T 细胞和记忆 T 细胞是主要类型的 HIV-1 潜伏库细胞。在记忆 T 细胞中，中枢性记忆 T 细胞（TCM）和过渡性记忆 T 细胞（TTM）两种亚型被证明是主要的潜伏库细胞。巨噬细胞、树突状细胞等细胞类型中也可能存在潜伏的 HIV-1，但机制研究相对较少。通过对体外培养细胞模型的研究，发现诸多因子都可以通过调节整合 HIV-1 前病毒的转录和转录后表达而影响其潜伏状态。比如，宿主细胞中像 NF-κB、NFAT 等转录激活因子的缺乏，APOBEC3G 等转录抑制因子的存在，由转录后调节引起的表观沉默（epigenetic silencing），病毒 Tat、Rev 等调节蛋白的缺乏等，都可以导致 HIV-1 的潜伏表型。但是，这些因子都是通过与已经整合的前病毒作用发挥功能的，也就是在维持和激活 HIV-1 潜伏状态中起作用。已经知道，HIV-1 在感染活化状态的 $CD4^+$ T 细胞后，整合的前病毒会持续不断地转录合成病毒粒子，迅速导致被感染细胞的凋亡，因而无法让已整合的前病毒保留下来，形成潜伏病毒；而另一方面，如前所述，HIV-1 RNA 进入静息态的 $CD4^+$ T 细胞后虽然可以逆转录成为双链 DNA，但该 DNA 不能被整合至宿主基因组中，最终也会被降解，因而无法形成可长期存在的潜伏病毒。因此，一个关键的问题是：在那些潜伏库细胞中，是什么初始机制使 HIV-1 DNA 既能被整合而又不会被转录因而可以潜伏形式长期存在，即 HIV-1 潜伏感染最初是如何建立形成的？

对于这一问题，目前尚缺乏深入和全面的了解。较为普遍接受的假说认为，一小部分活化状态的初始 $CD4^+$ T 细胞被 HIV-1 感染后，在其被病毒或机体免疫机制杀死前，转变成了静息状态的记忆 T 细胞。这一转变过程伴随着 HIV-1 转录表达机制的关闭或强烈抑制，形成潜伏前病毒（图 1，途径 1）。据此推断，向记忆 T 细胞转变过程中的 T 细胞在被 HIV-1 感染后，最有可能成为潜伏库细胞。也有人提出假说，HIV-1 感染的静息态初始 T 细胞（图 1，途径 2a）或记忆 T 细胞（图 1，途径 2b）在被较弱的活化信号（如白介素 2、白介素 4 等）刺激后，胞质中游离的 HIV-1 双链 DNA 可以进入细胞核，整合到宿主基因组中，形成潜伏前病毒。另有人认为，潜伏感染也有可能在胸腺细胞形成阶段（thymopoiesis）发生，因为未成熟的 $CD4^+$、$CD8^+$ 胸腺细胞转录和代谢活动都比较活跃，可以支持感染后 HIV-1 的整合、转录和少量复制。而当这些细胞分化成

静息态的初始 T 细胞时，HIV-1 转录复制停止，从而使 HIV-1 前病毒以潜伏形式存在于少量初始 T 细胞中。

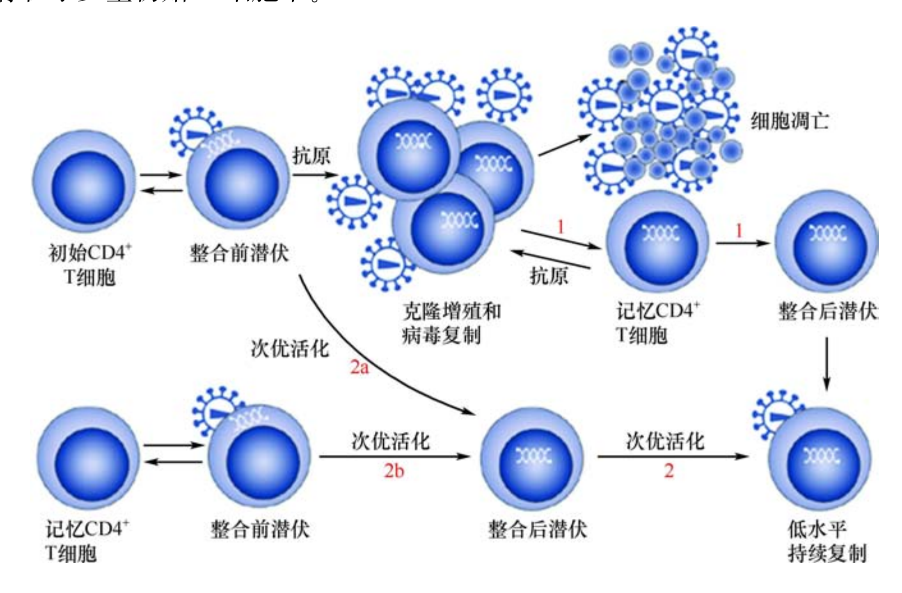


图 1　艾滋病病毒建立潜伏感染的可能途径

修改自 Coiras M，et al. 2009. Nature Reviews Microbiology，7（11）：798～812

4. 主要难点及对策

由于能形成潜伏感染的 $CD4^+$ T 细胞只占艾滋病患者体内 HIV-1 宿主细胞的极小比例，并且目前缺乏能用于有效分选潜伏感染细胞的生物标记物（比如表面标志蛋白），因而通过直接分离患者体内潜伏感染的 $CD4^+$ T 细胞来研究潜伏感染形成机制十分困难。因此，比较可行的方案是通过在体外原代培养的 $CD4^+$ T 细胞（或含有 $CD4^+$ T 细胞的组织）中建立潜伏感染模型，来研究潜伏感染的形成机制。需要建立的关键技术之一是如何在细胞静息状态下能分选出已经形成潜伏感染的细胞。

研究者试图通过三条途径来对付艾滋病病毒的潜伏问题。第一，优化和强化目前的 HAART 治疗方案，尽可能抑制新生病毒的产生和新的感染，通过潜伏库细胞在人体内的自我更新，来达到最终清除潜伏病毒的目标。但是，由于潜伏库细胞的自我更新非常缓慢，这一方案实际上意味着患者需要终生服药。第二，免疫抑制剂和 HAART 结合使用的治疗方案，抑制 T 细胞的活化，从而避免潜伏病毒的激活和表达。但是，这只是一种被动防范的措施，没有从根本上消除病灶，并且长期使用免疫抑制剂通常会导致比较严重的毒副作用。第三，主动激活潜伏病毒的表达，使之可以被 HAART 作用后得以清除。从理论上讲，这是一条治本的途径。但是，目前的候选药物靶标都是在维持 HIV-1 潜伏状态中起作

用的广谱作用因子（比如阻碍基因转录的组蛋白去乙酰化酶，HDAC），缺乏特异性，因而非常有必要在进一步深入了解潜伏感染建立机制的基础上，研发针对相应机制的药物，以降低药物的非特异性作用。然而，HIV-1潜伏感染在不同类型的潜伏库细胞中可能是通过不同的机制建立形成的，针对某一种机制的药物可能只能激活和清除部分潜伏库病毒。因此，如何能在专一有效地清除艾滋病患者体内所有潜伏库病毒的同时，对正常免疫细胞和机体组织造成最小危害，将是人类根治艾滋病征程中面临的一大难题。

参考文献

Brooks DG, Kitchen SG, Kitchen CM, et al. 2001. Generation of HIV latency during thymopoiesis. Nature Medicine, 7(4): 459～464

Chomont N, El-Far M, Ancuta P, et al. 2009. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. Nature Medicine, 15(8): 893～900

Chun TW, Carruth L, Finzi D, et al. 1997. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. Nature, 387(6629): 183～188

Coiras M, López-Huertas MR, Pérez-Olmeda M, et al. 2009. Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs. Nature Reviews Microbiology, 7(11): 798～812

Finzi D, Hermankova M, Pierson T, et al. 1997. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. Science, 278(5341): 1295～1300

Folks TM, Justement J, Kinter A, et al. 1987. Cytokine-induced expression of HIV-1 in a chronically infected promonocyte cell line. Science, 238(4828): 800～802

Marsden MD, Zack JA. 2010. Establishment and maintenance of HIV latency: model systems and opportunities for intervention. Future Virology, 5(1): 97～109

Mosca JD, Bednarik DP, Raj NB, et al. 1987. Herpes simplex virus type-1 can reactivate transcription of latent human immunodeficiency virus. Nature, 325(6099): 67～70

Wong JK, Hezareh M, Günthard HF, et al. 1997. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. Science, 278(5341): 1291～1295

撰稿人：王英杰
浙江大学医学院附属第一医院

慢性乙型肝炎抗病毒治疗的挑战

Challenge of Antiviral Therapy in Chronic Hepatitis B

我国属于乙型肝炎（简称乙肝）高流行区，慢性乙肝病毒感染人群约 1.3 亿。对肝功能异常或存在肝组织学损伤的慢性乙肝病毒感染者目前主张采用干扰素或核苷类药物抗病毒治疗，可以抑制病毒复制，减轻肝脏损伤和疾病进展；而对肝功能正常及无明显组织学损伤的慢性乙肝病毒感染者主张暂不治疗，干扰素对这部分患者的疗效较差，核苷类抗病毒药物由于疗程的不确定性，也不推荐使用，但并非意味着这部分患者不需要治疗，是真正意义的健康携带者，而是没有更好治疗措施下的无奈等待，因为现有的抗病毒治疗方案均不能从患者体内清除乙肝病毒。

HBV 属嗜肝 DNA 病毒，侵入人体后进入肝细胞内，病毒 DNA 进入细胞核，在宿主和病毒 DNA 聚合酶的作用下，形成双链完整共价闭合环状 DNA（covalently closed circular DNA，cccDNA）。cccDNA 在复制过程中，可以转录为不同大小的 mRNA，并翻译成为各种病毒蛋白。其中 3.5kb 的 mRNA 含有 HBV DNA 序列上的全部遗传信息，称为前基因组 RNA，作为逆转录模板，在 HBV 逆转录酶作用下，合成负链 DNA，再以负链 DNA 为模板，在 HBV DNA 聚合酶作用下，合成正链 DNA，形成完整子代病毒 DNA，最后装配成新的 HBV 颗粒，释放至肝细胞外。另有部分子代病毒 DNA 进入肝细胞核内，形成新的 cccDNA 并继续复制。cccDNA 很难从体内彻底清除，是 HBV 感染慢性化和抗病毒药物停用后病情反复的主要原因所在。

慢性乙肝的治疗，抗病毒是关键，只要有适应证，且条件允许，就主张进行规范的抗病毒治疗。目前公认有效并被广泛采用的两类抗乙肝病毒药物是干扰素 α和核苷（酸）类似物，二者在降低血清病毒载量和控制病情方面取得了不少成就，但离治愈乙肝的目标相差甚远，甚至连持续控制血清病毒载量至可检测水平以下的目标都难以达到。

1. 干扰素抗病毒的机制及缺陷

干扰素 α（interferon，IFN-α）具有广谱抗病毒作用。它通过与细胞表面特异性受体结合，诱导细胞表达多种抗病毒蛋白，包括蛋白激酶 A（proteinkinase A，PKA），2′-5′寡腺苷酸合成酶（2，5-oligo adenylate synthetase，OAS）、RNA 特异性腺苷脱氨酶（adenosine deaninase acting on RNA，ADAR）和 Mx

蛋白等，可抑制病毒 DNA 复制和 RNA 合成，促进病毒 RNA 降解，抑制病毒蛋白的合成、转运及病毒颗粒的成熟和分泌，其治疗的疗程相对固定，不引起乙肝病毒耐药变异。但是干扰素治疗总体有效率仅约 40%，疗效与患者性别、肥胖、治疗前 ALT 水平、是否为母婴传播等密切相关，不良反应较多，部分有适应证的患者难以耐受，停药后有相当比例的患者会出现病毒反弹。

2. 核苷类药物抗病毒的机制及难题

核苷类抗病毒药物是模拟天然核苷的结构，作用靶点多为 RNA 病毒的逆转录酶或 DNA 病毒的 DNA 聚合酶，竞争性地作用于酶活性中心，嵌入正在合成的病毒 DNA 链中，终止 DNA 链的延长，从而抑制病毒复制。

目前国内已上市用于慢性乙肝抗病毒治疗的四种核苷类药物，包括了 DNA 合成过程所需的腺嘌呤 A（阿德福韦酯 adefovir dipivoxil，ADV）、胸腺嘧啶 T（替比夫定 telbivudine，LDT）、胞嘧啶 C（拉米夫定 lamivudine，3TC）、鸟嘌呤 G（恩替卡韦 entecavir，ETV）四种核苷酸，都是通过模拟天然底物竞争性抑制 HBV DNA 的复制。核苷类药物均需长期坚持服药以抑制病毒复制，临床应用面临很多难题，如高病毒载量患者外周血病毒控制不理想；难以长治久安，随治疗时间延长，耐药变异和病毒反跳概率增加；疗程不确定和停药后病毒反弹令很多患者难以接受；长期用药的安全性也是值得关注的问题。

3. 寻找清除或彻底控制乙肝病毒的治疗措施是关键

（1）药物“清除”病毒面临的难题和挑战：鉴于 cccDNA 是乙肝病毒在肝细胞内复制的初始模板，只有清除或彻底抑制细胞核内的 cccDNA，才是真正意义上治愈了慢性乙肝。目前国际上还缺乏能直接作用于 HBV cccDNA 的药物。核苷类药物只能干预细胞质内前基因组 RNA 逆转录形成病毒 DNA 负链和以负链为模板进行正链延伸的过程，不但不能清除 cccDNA，其对肝细胞内 HBV 复制的抑制也不显著。有报道，拉米夫定治疗患者的外周血 HBV DNA 水平下降数个数量级时，肝细胞内 HBV DNA 只下降至治疗前的 1/3～2/3，并没有达到数量级上的变化。由于肝细胞内 cccDNA 池是动态更新的，虽然有关 cccDNA 半衰期的报道相差较大，从几天到几十天不等，若能彻底抑制细胞内 HBV 的复制，就能阻止细胞核内 cccDNA 池更新，从理论上讲就有可能使 cccDNA 池耗竭而治愈乙肝。cccDNA 在细胞内形成及代谢的一些关键环节目前还不清楚，这一过程的阐明，将有助于指导开发新的、可能清除 cccDNA 的抗病毒药物。

其次，乙肝病毒进入肝细胞的机制也未明了，在阻止感染新的肝细胞这一环节缺乏新的靶向药物。

（2）抗病毒免疫治疗面临的难题和机遇：感染乙肝病毒时的年龄是影响预后最主要的因素。母婴传播和婴幼儿时期感染者，分别有 90% 和 25% ～30% 将发展成慢性感染。而青少年和成人 HBV 感染者，仅 5% ～10% 发展成慢性，绝大

部分感染者都在保全肝细胞的同时清除了 HBV，深入研究其机制，将为通过免疫清除 HBV 感染带来新的治疗思路。

另外，部分既往急性自限性 HBV 感染者血清 HBsAg 和 HBV DNA 均阴性，并出现 HBsAb，但在应用激素、免疫抑制剂、化疗药物或美罗华等后出现了乙肝病毒再激活并有肝炎活动，表明这部分患者肝组织内仍残存有痕量的 cccDNA，cccDNA 潜伏是其乙肝发作的主要原因，提示急性自限性感染过程和慢性自发性病毒清除过程可能并不需要完全清除所有肝细胞内的 HBV cccDNA。这些患者体内 cccDNA 不完全清除但复制被有效控制机制的阐明，将为“治愈”乙肝带来新的机遇。

参考文献

杨德刚,缪晓辉.2007.对乙型肝炎病毒共价闭合环状 DNA 的再认识.中华医学杂志,7(26)：1867～1870

Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, et al.2000.Quantification of intrahepatic hepatitis B virus (HBV) DNA in patients with chronic HBV infection.Hepatology,31:507～512

Guidotti LG, Rochford R, Chung J, et al.1999. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection.Science,284:825～829

Sung JJ, Wong ML, Bowden S, et al.2005. Intrahepatic hepatitis B virus covalently closed circular DNA can be a predictor of sustained response to therapy. Gastroenterology, 128: 1890～1897

Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, et al.2004. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. Gastroenterology,126:1750～1758

Yuen MF, Wong DK, Sablon E, et al.2004. HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B in the Chinese: virological, histological, and clinical aspects. Hepatology,39:1694～1701

撰稿人:谢 青 姜 山

上海交通大学医学院附属瑞金医院

肝衰竭器官替代治疗

Organ Replacement Therapy for Patients with Hepatic Failure

1. 肝衰竭防治是世界性医学难题，器官替代治疗有望成为肝衰竭治疗的突破口

肝脏是人体内化学合成、解毒、生物转化、代谢的加工厂，病毒、药物、酒精等多种因素均可造成肝脏严重损害，直至肝衰竭。肝衰竭是指肝脏合成、解毒、排泄和生物转化等功能发生严重障碍或失代偿，出现以凝血障碍、黄疸、肝性脑病、腹水等为主要表现的一组临床综合征。据 WHO 统计，全球急、慢性肝衰竭患者近 1200 万，研究显示肝衰竭患者仅接受内科综合治疗病死率高达 60%～80%。肝衰竭严重威胁着人类的健康，如何科学应对及防治肝衰竭是世界性的医学难题。

肝脏具有强大的再生能力。如能探寻确实有效的肝衰竭治疗新方法，暂时替代衰竭肝脏功能，使肝细胞获得再生的机会，将有望使肝功能得以恢复、肝衰竭患者渡过难关得以生存，或为患者争取等待供肝的时间进行肝移植。因此，器官替代治疗有望成为肝衰竭治疗的突破口。

2. 肝衰竭器官替代治疗研究进展及难点

20 世纪 60～70 年代，科研工作者研究活性炭吸附替代肝脏解毒功能的作用，因其生物相容性差、临床应用副作用大、疗法单一、疗效不佳而未能在临床上推广。我国科研工作者从 20 世纪 80 年代中期开始针对上述难点进行攻关，根据不同的病情采用血浆置换、血液透析、血液滤过、血浆吸附等方法单独或者联合治疗肝衰竭患者，暂时替代肝脏的解毒功能，补充蛋白质、凝血因子，纠正血流动力学紊乱，创建了独特有效的人工肝支持系统（ALSS），取得了重大的进展和突破，显著降低了肝衰竭患者的病死率。ALSS 在临床上广泛应用并推广至全国，取得显著效果。虽然 ALSS 取得了重大突破，但尚缺乏生物合成和转化功能，难以全面替代肝脏的功能。20 世纪 90 年代末至 21 世纪初，国内外掀起了生物人工肝研究的热潮，深入研究具备合成、解毒、生物转化等功能的肝细胞源和使肝细胞发挥最佳功能的生物反应器。将两者相结合的生物人工肝已成为肝衰竭器官替代治疗的热点。

理想的生物人工肝，从理论上讲是构建一个和肝脏类似的人工器官，替代肝衰竭患者肝脏的功能。目前存在两大方面的难点：一是缺乏稳定可靠的细胞源，

二是缺乏性能结构合理的生物反应器。可靠的细胞源是目前生物人工肝研究的热点和难点之一。现有的“种子细胞”远不能满足临床应用要求。动物源性肝细胞有致动物疫源性疾病的风险；肿瘤来源的肝细胞系虽可大量增殖并成规模培养，但肝细胞的功能下降，且有致瘤的风险；胎肝细胞虽较理想，但受伦理学的限制不易长期大量获得并且难以在体外扩增保存。干细胞（包括骨髓间充质干细胞、脐血干细胞、诱导多能干细胞等）是极具发展前景的生物人工肝用肝细胞源。目前干细胞分离、培养技术已取得长足的进展，以干细胞和组织工程技术为基础的再生医学也正经历着飞速的发展，但仍面临着干细胞数量有限、缺乏稳定的定向诱导分化技术等问题，短期内难以获得大量治疗用肝细胞。生物反应器是生物人工肝的核心装置，当今在世界范围内生物反应器发展迟缓，现有的装置在材料、结构设计及效果等方面均远未达到理想的程度，如反应器材料的生物相容性、培养肝细胞的密度及规模、血浆与肝细胞间的物质交换效率等均需有较大程度的改进。如何使生物反应器最大限度地模仿正常肝脏的组织结构、为培养肝细胞提供类似于体内的生存及代谢环境是今后研究的又一难点所在。

3. 创建有效的肝衰竭器官替代治疗新方法

肝细胞源难点的突破口在于构建安全高效的可逆性人源性永生化肝细胞以及能经济方便地利用干细胞诱导分化成肝细胞的研究。利用正常成人肝细胞导入永生化基因和自杀基因，构建可逆性永生化正常成人肝细胞（图 1），增加肝细胞的增殖活力，以通过体外培养获得大量的肝细胞，在需要时可诱导其去永生化，为生物人工肝提供可靠安全的细胞源，需重点解决切除永生化基因效率等问题。干细胞在体外大量增殖并定向分化为肝细胞是解决细胞源难题的另一可行途径。现着重于高效率地分离、筛选高纯度、高特异性的干细胞，建立稳定的诱导干细胞分化为肝细胞的体外培养系统，如能突破无疑将为人工肝的发展带来里程碑式的进步。目前使用的生物反应器主要以中空纤维型多见，但物质交换效率不高。近期一种以可逆性永生化人源性肝细胞为细胞源、以微囊悬浮型漏斗形流化床式生物反应器为核心的生物人工肝治疗系统已构建成功（图 2），并进行肝衰竭模型猪的治疗，显著提高了其生存时间。今后必须更注重开发适宜生物反应器的新型材料及改进生物反应器的结构设计，使之在流体力学及几何学等方面更接近生理状态。设计更合理的人工肝辅助装置，避免体外循环分泌物质进入患者体内后的过敏反应，使之更接近于体内肝

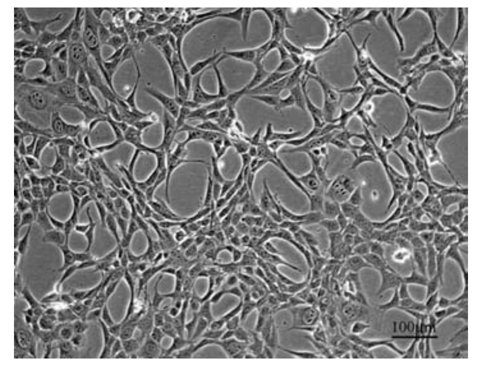


图 1　可逆性人源性永生化肝细胞

细胞生长代谢与物质交换的微环境。近年来科学家进行了以干细胞为基础、可降解仿生支架和肝脏去细胞化支架为载体的再生肝脏研究，为各种原因所致的终末期肝病治疗提供了新的途径。

经过近半个多世纪的发展，肝衰竭器官替代治疗已取得重大进展，今后的重点是对生物人工肝进行研究，针对生物人工肝的两大难点进行深入攻关，构建出既拥有安全可靠细胞源又具备类似肝脏结构生物反应器的生物型人工肝支持系统，引领未来人工肝研究。人工肝脏属于交叉学科，需要材料学、细胞学、工程学、基础医学与临床医学等多学科的不断发展和集成创新。生物人工肝辅以非生物人工肝的优化组合将不断得到改进和完善，干细胞和再生肝脏的研究有望取得突破，器官替代治疗将为肝衰竭患者健康带来福音。

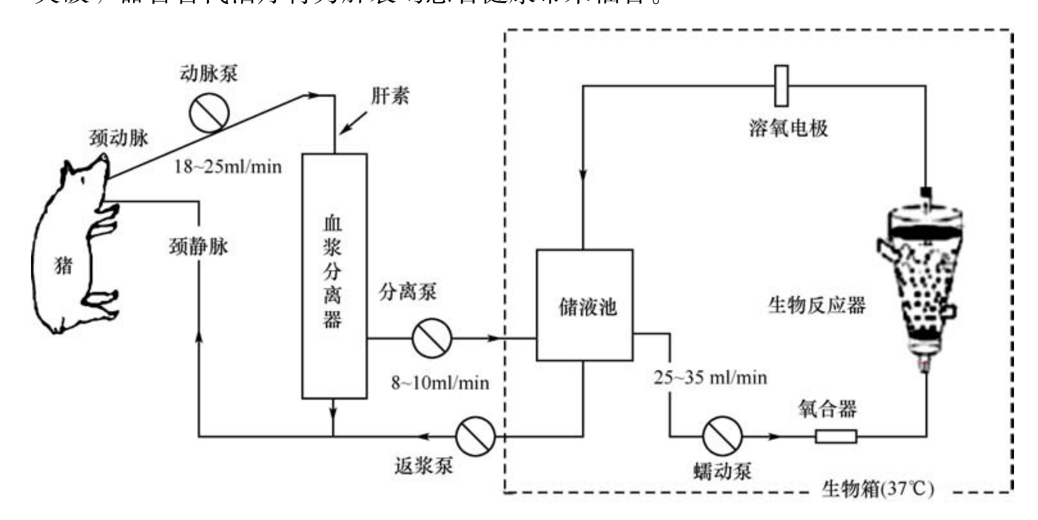


图 2　微囊悬浮型流化床式生物反应器为核心的生物人工肝系统治疗示意图

参 考 文 献

李兰娟.2001.人工肝脏.杭州：浙江大学出版社，72

Allen JW，Hassanein T，Bhatia SN.2001.Advances in bioartificial liver devices.Hepatology，34(3)：447～455

Gagan K Sood.2011.Acute Liver Failure—Overview.eMedicine Gastroenterology.http://emedicine.medscape.com/article/177354-overview.2011-3-29

Jalan R，Sen S，Williams R.2004.Prospects for extracorporeal liver support.Gut，53(6)：890～898

Li J，Tao R，Wu W，et al.2010.3D PLGA scaffolds improve differentiation and function of bone marrow mesenchymal stem cell derived hepatocytes.Stem Cells Dev，19(9)：1427～1436

Li LJ，Zhang YM，Liu XL，et al.2006.Artificial liver support system in China：a review over the last 30 years.Therapeutic Apheresis and Dialysis，10(2)：160～167

Strain AJ, Neuberger JM. 2002. A bioartificial liver - state of the art. Science 295(8): 1005～1009

Tacke S, Bodusch K, Berg A, et al. 2001. Sensitive and specific detection methods for porcine endogenous retroviruses applicable to experimental and clinical xenotransplantation. Xenotransplantation, 8(2): 125～135

Van de Kerkhove MP, Hoekstra R, Chamuleau RA, et al. 2004. Clinical application of bioartificial liver support systems. Ann Surg, 240(2): 216～230

Yu CB, Pan XP, Li LJ. 2009. Progress in bioreactors of bioartificial liver. HBPD INT, 8(2): 121～127

撰稿人：李兰娟

浙江大学

微生态破坏导致严重感染的巨大挑战

The Challenge of Severe Infection Caused by the Disturbance of Gut Microbial Ecology

1. 破坏肠道微生态，损害人体健康，是人类面临的重要生态问题

21世纪人类不但面临宏观生态破坏的危险，而且随着抗菌药物、免疫抑制剂等的广泛使用，还面临微观生态（微生态）破坏的严重问题，人体微生态的破坏可以导致各种感染的发生发展，严重威胁人类的健康。感染是微生物对宿主或宏生物的异常侵染、微生物与宿主或宏生物之间相互作用的一种生物学现象。

在人类的进化史中，微生物是人类密不可分的“伙伴”，与人体共同构成了一个“超生物体”（super-organisms）。人体携带的微生物细胞总数是人体细胞的10倍，其中肠道微生物所占比例最大，细胞数达10万亿～100万亿，重达1.2kg（图1），接近人体肝脏的重量；其基因数量是人类基因组的50～100倍，被称为“人类元基因组（human metagenome）”。这些正常微生物对人体健康具有重要的营养、免疫和肠道屏障功能等生态作用。抗菌药物、免疫抑制剂、放化疗等各种医疗手段的广泛应用，挽救了危重患者的生命，但随之而来的微生态破坏引起细菌移位、内源性感染及细菌耐药，如“超级细菌”的快速形成与流行，导致难以控制的甚至是致命的感染，这是人类面临的重大难题。面对微生态破坏的巨大挑战，我国科学家20世纪90年代初就开始对微生态与感染的关系进行研究，并于2002年出版了首部《感染微生态学》（*Infectious Microecology*）专著，即“用微生态学的理论和方法研究感染的发生、发展和结局，引导感染向宿主健康方向转移的微生态学”。最近《Science》、《Nature》等杂志报道：肠道微生物为人体提供营养、调控肠道上皮发育和诱导先天性免疫，其功能相当于人体一个重要的“器官”，破坏肠道微生态就是损害人体健康。21世纪，微生态与感染的相关问题已成为国际研究的热点。如何阻止日益严重的微生态破坏已是人类面临的巨大挑战。

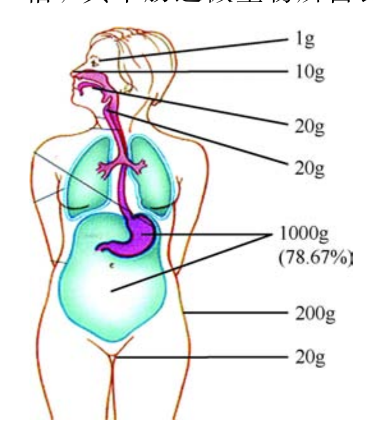


图1　人体重要腔道微生物分布及重量

2. 微生态与感染研究难点及进展

感染微生态研究的第一大难点是研究复杂系统下的微生态失衡导致感染及多器官功能不全综合征（MODS）的转归机制，以及各种不同原因如何破坏微生态平衡导致正常部位微生物定位、定量的改变，通过何种机制引起新的感染。已有研究表明，肠道微生态失衡对肝病重症化直至肝功能衰竭的发生发展具有重要作用。首先，肠道微生态失衡使肠源性内毒素产生并大量进入肝脏，同时肝脏对其解毒功能下降，引起血液内毒素水平升高，启动 TNF-α 等炎症因子大量释放，最终加重肝脏损害；同时，肝功能衰竭又促进肠道微生态失衡的加重，形成恶性循环，互为因果，即肝病的恶化促进肠道微生态失衡，而肠道微生态失衡又引起内毒素产生过量，肠壁通透性增强，肠道菌群易位或肠源性物质增加，进而加重肝脏损害。传统的微生物培养方法未能深入探明肝病微生态分子机制，元基因组和代谢组的研究有助于阐明其微生态分子机制，探寻分子干预治疗疾病的措施。

认识肠道微生态平衡状态下的元基因组及其功能是阐明肠道微生态与感染发生机制的第二个难点。每个个体肠道微生物数以亿计，拥有独特的微生态构成，即使同一个体，不同部位与不同时间的肠道微生物组成也存在一定差异。目前，针对肠道微生态的国际人类元基因组研究计划（HMP）已启动。感染微生态研究需要新的方法与高科技手段。以往由于方法的局限性，超过 90% 的肠道菌群无法通过传统的方法进行培养和鉴定，不能全面、系统地阐明肠道微生态对健康和疾病的影响。同时由于人体整体系统生物的复杂性以及肠道微生态与人体复杂关系，加大了研究困难程度。近年来，随着系统生物学和各种组学如基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢组学研究与技术的发展，运用多学科交叉研究成果，可以对肠道微生物与人体代谢的调节作用进行精确的关联研究（图 2）。这些新技术不仅能快速、动态研究感染过程中的分子变化，同时为生物信息学研究提供了新的机遇。直接从生物样品提取和确定基因组序列并加以功能注释，是当今感染微生态研究的最前沿方向。感染微生态研究还需要有特殊的动物模型，其中无菌动物的大规模培养和应用也是必须解决的问题。

如何预防和控制细菌新型耐药基因产生与流行是抗感染微生态研究面临第三个难点。肠道元基因组中存在大量潜在的耐药基因，并且与已出现的耐药基因在遗传上距离甚远，阐明耐药基因的发生以及在不同病原菌间的传播机制是感染微生态研究的新方向。当前迫切需要探索肠道微生态失衡与新耐药基因产生的相关性及其与内源性感染发生、发展的关键分子机制以及如何合理应用抗生素和微生态调节剂。在感染发生时必须用抗生素治疗，而抗生素治疗又会引起微生态失衡，导致新的感染，如何正确应对这对矛盾，要达到既治疗感染、又避免微生态失衡的目标尚需努力。

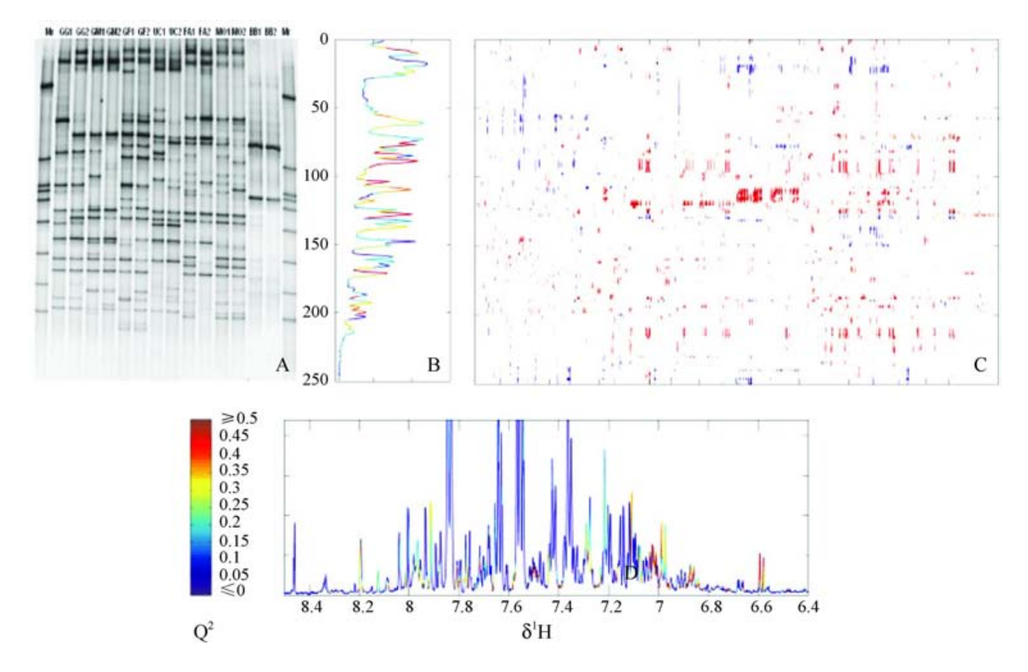


图 2　多变量统计分析人体肠道菌群与尿液代谢谱相关性

A. 肠道柔嫩梭菌亚群 DGGE 指纹谱；B. OPLS 建模分析尿液 NMR 谱对肠道柔嫩梭菌亚群 DGGE 谱的影响分析；C. 肠道柔嫩梭菌亚群与尿液代谢谱共变异分析；D. OPLS 建模分析肠道柔嫩梭菌亚群 DGGE 谱对尿液代谢物质的影响分析。图中红色表示参与人体代谢的关键功能菌及其代谢物质

3. 展望

21 世纪人类将面临各种抗感染挑战，包括新的病原体、抗生素耐药性及癌症等。近年来，暴发性传染病如 SARS、甲型 H1N1 流感等给人类带来严重的灾难，然而人类对这些疾病的微生态机制及其发生过程知之甚少。这些难题的研究和解决，不仅对明确微生态与感染的分子机制有重要意义，而且还能促进对非感染性疾病（如肥胖症、炎性肠炎综合征、糖尿病等）分子机制的认识，为微生态破坏导致的严重感染提供新的研究方向和应对策略，以促进医学学科发展、提高疾病防治水平、减少相关疾病的发生、保障人类健康。

参 考 文 献

李兰娟. 2002. 感染微生态学. 北京：人民卫生出版社

吴仲文，徐凯进，李兰娟，等. 2006. 78 例肝硬化患者肠道细菌易位及其相关性研究. 中华外科杂志，44：1456～1459

Costello EK, Lauber CL, Hamady M, et al. 2009. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. Science, 326(5960): 1694～1697

Gill SR, Pop M, Deboy RT, et al. 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. Science, 312(5778): 1355～1359

Lederberg J. 2000. Infectious history. Science, 288(5464): 287～293

Li LJ, Wu ZW, Ma WH, et al. 2001. Changes in intestinal microflora in patients with chronic severe hepatitis. Chin Med J(Engl), 114(8): 869～872

Li M, Wang BH, Zhang ML, et al. 2008. Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. Proc Natl Acad Sci USA, 105(6): 2117～2122

Riordan SM, Williams R. Gut flora and hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. N Engl J Med, 362(12): 1140～1142

Xing HC, Li LJ, Xu KJ, et al. 2006. Protective role of supplement with foreign bifidobacterium and lactobacillus in experimental hepatic ischemia-reperfusion injury. J Gastroenterol Hepatol, 21(4): 647～656

撰稿人：李兰娟
浙江大学

细菌耐药

Bacterial Resistance

1. 背景

1929 年，英国微生物学家弗莱明（Fleming）发现青霉素，1941 年青霉素开始应用于临床，开创了感染性疾病治疗的新纪元，是现代医学具有划时代意义的事件。自青霉素发现以来先后有 20 余大类抗生素（antibiotics）先后被发现与应用，这些药物都来自于自然界中链霉菌或放线菌的代谢产物，包括青霉素类、头孢菌素类、大环内酯类、氨基糖苷类、糖肽类等，被统称为抗生素；同时通过化学合成方法也得到了大量具有类似作用的化学药物，如磺胺类、喹诺酮类、呋喃类、硝基咪唑类等，这些药物和抗生素被统称为抗菌药物（antibacterial agents）。

抗菌药物应用于临床之初，部分学者惊呼人类找到了治疗感染的魔弹，并且宣布感染性疾病很快会被人类攻克，将不再成为威胁人类健康的疾病；但在人们还沉浸在这种欢愉之中的时候，科学家惊讶地发现，细菌针对抗菌药物的杀灭作用，很快产生了抵抗力，也即细菌耐药（bacterial resistance）。细菌的耐药性随着抗菌药物的应用不断出现并广为流行，其产生速度与耐药程度已经超越新型抗菌药物的研究与开发速度，细菌耐药还具有不断累加的能力，迄今为止，临床上多重耐药（multi-drug resistance）和泛耐药（pan-resistance）的超级耐药菌（super-bug）十分常见，导致抗菌药物失效，感染患者病死率增加；进入 21 世纪，耐药细菌感染已经成为住院患者感染的主要病原菌，严重威胁患者安全；细菌耐药也给社会经济发展带来了巨大灾难，2002 年世界结核日，卫生部宣布每年仅耐药结核就造成我国高达 90 亿元的经济损失。为此，世界卫生组织宣布细菌耐药已经成为威胁人类安全的重大公共卫生问题之一，呼吁各成员国积极采取行动，尽快遏制细菌耐药的发展。

2. 耐药机制与流行情况

抗菌药物与细菌耐药是一对矛盾的两个方面，抗菌药物对于细菌属于一种外部损害，作为一种生物物种，面对各种外部损害会产生相应的应对与抵抗反应，对于抗菌药物的抵抗就形成对药物的耐受，这是生物延续的本能，因此，抗菌药物的应用必然导致细菌的耐药，这是无法避免的客观现实。

细菌面对不同的抗菌药物，会产生不同的应对措施，也即不同的耐药机制，迄今为止已经发现的细菌耐药机制可以分为四大类。

（1）细菌对抗菌药物的水解作用：细菌产生各种抗菌药物水解酶，可以水解来自于自然界的抗生素，如水解青霉素、头孢菌素的β-内酰胺酶，破坏氨基糖苷类药物的乙酰化酶与磷酸化酶，水解氯霉素的乙酰化酶等。

（2）抗菌药物靶位改变：抗菌药物需要作用在细菌的一定部位发挥杀菌或抑菌作用，细菌在抗菌作用压力下发生基因突变，改变与抗菌药物结合的核酸或蛋白质结构，药物与抗菌靶位亲和力下降，无法发挥抗菌作用。如临床常见的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（methicillin-resistant *Staphyloccous aureus*，MRSA）通过外源基因的引入，产生和抗菌药物亲和力极低的青霉素结合蛋白，替代抗菌药物靶蛋白功能而导致耐药。

（3）细菌对抗菌药物的屏障作用：抗菌药物的作用靶位大多存在于细胞内蛋白质和核酸，发挥抗菌作用必须进入细菌体内，药物需要穿透细胞壁和细胞膜等结构；耐药细菌通过改变细胞膜结构成分，特别是作为药物转运的孔蛋白（porin）的改变，包括数量减少及结构变化，都可以导致药物透过减少，难以发挥抗菌作用。如革兰阴性细菌外膜蛋白 Opr D2 减少导致细菌对亚胺培南耐药。

（4）细菌对抗菌药物的主动外排：正常细菌的细胞膜存在排出其代谢产物与毒素等主动外排泵，当细菌接触抗菌药物后，外排泵会发生改变，抗菌药物成为其底物，进入菌体内抗菌药物被迅速排出体外，细菌对药物敏感性下降。细菌主动外排耐药在多种细菌中存在，如大肠埃希菌的 AcrAB-TolC、铜绿假单胞菌的 MexAB-OprM、鲍曼不动杆菌的 AdeABC 等。主动外排常常导致细菌对多种结构无关的抗菌药物发生耐药，如喹诺酮类、头孢菌素、碳青霉烯类、氯霉素等。

细菌耐药的遗传学基础也比较复杂，除了细菌染色质 DNA 外，细菌还可以通过多种方式获得外源基因，如转化、结合、转导等，这些外源基因包含在质粒（plasmid）、转座子（transposon）、整合子（intergron）等可移动遗传子中，在染色质和移动遗传子间穿梭，还可以在同种甚至不同种类细菌间扩散，导致耐药菌的广泛流行。

由于细菌耐药机制多样及抗菌药物的广泛使用，特别是不合理应用，细菌耐药产生速度越来越快，耐药程度越来越严重；监测发现世界各国 MRSA 检出率为 3%～60%，产超广谱 β-内酰胺酶（extended spectrum β-lactamase，ESBL）大肠埃希菌为 5%～50%，对喹诺酮类耐药大肠埃希菌（fluoroquinolone resistant *Escherichia coli*，FQR-EC）在部分地区超过 50%，多重耐药铜绿假单胞菌（multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*，MDR-PA）部分地区高达 40% 以上；我国细菌耐药监测结果也显示，上述几种耐药菌在我国呈持续上升态势，部分细菌耐药率居全球前列（图 1）。

3. 细菌耐药的应对与难题

细菌耐所造成的后果非常严重，有人甚至提出了后抗生素时代（post antibi-

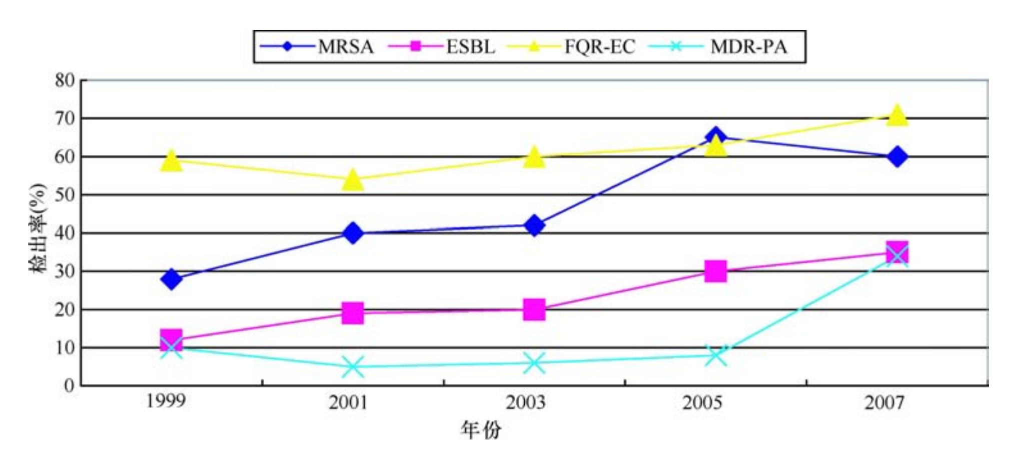


图 1　我国临床常见耐药细菌的检出情况

[illegible] 的概念，意在提醒全社会注意细菌耐药发展动向，避免人类重新进入没有抗菌药物可用的危险时代。针对细菌耐药，科学家进行了大量深入研究，希望通过不断发现新的抗菌药物来解决细菌耐药的问题，但结果令人遗憾，近年来抗菌药物的研究与开发越来越困难，新型抗菌药物进入临床越来越少，细菌耐药问题已经成为 21 世纪所面临的突出科学难题。

倡导合理使用抗菌药物，减少抗菌药物压力，可以减缓细菌耐药产生的速度，但无法彻底消除细菌耐药产生的基础。克服耐药，首先必须明确细菌耐药产生的基础与耐药的起源，也即需要深入研究细菌对抗菌药物耐药的分子基础、传播与扩散机制，更需要探索细菌耐药基因的起源；现有研究发现，临床分离细菌的耐药遗传物质大多起源于环境微生物，掌握这些基因起源与分布，实施适当的理化干预，消除其存在条件，可以期望减少耐药的发生；另一方面，在药物研究与开发中，应该尽力寻找细菌所独有且长期稳定的基因、蛋白质或多糖作为抗菌药物靶位，开发针对这些靶点的特异性抑制剂，细菌脂多糖抑制剂就属于这类药物；对明确的细菌耐药机制，寻找逆转耐药性或克服耐药机制的药物或方法，恢复细菌对抗菌药物的敏感性；在此领域，临床已经使用的复方抗菌药物有 β-内酰胺酶抑制剂/β-内酰胺抗生素，前者通过抑制细菌所产生的 β-内酰胺酶，使细菌恢复对后者的敏感性而发挥抗菌作用；出于同类思路的药物还包括研究中的细菌主动外排抑制剂。研究与探索治疗细菌感染的新方法，也不失为解决细菌耐药的替代途径，如利用噬菌体清除细菌治疗感染、利用基因分子干扰技术、寻找人体或其他生物体内的抗菌物质都是克服细菌耐药研究的有益尝试。

参 考 文 献

Chopra I，Hodgson J，Metcale B，et al.1997. The search for antimicrobial agents effective against bac-

teria resistant to multiple antibiotics .Antimicrob Agent Chenmother ,41(3):497～503

Davies J .1994 . Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes .Science ,264 : 375～382

Grundamnn H , Aire-de-Sousa M , Boyce J ,et al .2006 .Emergence and resurgence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus as a public-health threat .Lancet ,368 :874～885

Martínez JL .2008 . Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments .Science , 321 :365～367

Nue H .1992 . The crisis in antibiotic resistance .Science ,257 :1064～1073

Sommer MOA , Dantas G ,Church GM .2009 . Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora .Science ,325 :1128～1131

Sulakvelidze A ,Alavidze Z ,Morris Jr JG .2001 . Bacteriophage therapy .Antimicrob Agent Chenmother ,45(3):649～659

Webb GF , D'Agata EMC , Magal P ,et al .2005 . A model of antibiotic-resistant bacterial epidemics in hospitals .PNAS ,102 ,13343～13348

Xiao YH , Wang J , Li Y .2008 . Bacterial resistance surveillance in China :a report from Mohnarin 2004～2005 .Eur J Clin Microbiol Infect Dis ,27 :697～709

撰稿人:李兰娟　肖永红

浙江大学

移植肠慢性失功能

Chronic Dysfuction of Small Bowel Transplant

肠移植是治疗不可逆转肠衰竭的理想治疗方法。Detterling 于 1964 年施行了第一例，但因排斥反应而失败。其后虽有人试用但都没能成功。1972 年免疫抑制剂应用于临床后，器官移植的成功率有所提高，但肠移植却因肠外营养成功应用于临床，似可替代肠道为无肠的病人提供营养，而有“人工胃肠”之称，肠移植的研究受到了推迟。直至 1987 年，因全肠外营养有严重的感染与代谢并发症，特别是肝损害严重，同时免疫抑制剂的应用不断得到改善，其他器官移植获得满意的效果，小肠移植重新被重视并加以研究。临床第一例肠与腹部多脏器联合移植于 1988 年获得成功。其后逐渐有所发展，但较之其他实质器官如肾、肝等的发展仍为缓慢。2009 年 9 月，第 11 届国际小肠会议注册统计，自 1985～2009 年 25 年间，全世界 22 个国家（包含中国在内）73 个中心进行了小肠移植（含肝肠、多器官移植）共 2291 例，至统计时止，存活者 1184 例，移植肠有功能者 785 例，其中 726 例不再需要从静脉补充营养，1 年成活率为 70%，3 年成活率为 60%，5 年存成率为 45%。总的来讲，小肠移植的效果不够理想，究其原因是小肠有别于其他实质器官：①肠道与肠系膜有大量的淋巴组织，含有的淋巴细胞数占全身的 60%，现认为肠是一免疫器官。移植急性排斥反应率高达 88%～100%。②肠道内含有大量细菌，极易发生感染，死亡病例的 87% 是由于感染。③肠道的功能复杂，消化吸收功能是主要的，但移植后能完全恢复功能的仅占 70%，且常需 6 个月以上恢复的时间。近年，免疫诱导的方法有改善后，1 年的成活率已达 90%，但后期的生存率未能得到改善，2 年成活率迅速降至 60%。其原因是慢性排斥反应、感染，尤其是真菌感染、病毒感染的发生率很高。再就是肠功能的恢复不完善，不能完全脱离静脉营养支持的比例仍较高。产生这些后果的原因是多因素的。首先是由于肠道淋巴组织多，免疫功能活性高，慢性排斥反应发生的频率高。同时，肠道的细菌多，肠屏障功能有所受损时极易发生肠道细菌易位，导致免疫功能活化产生排斥反应。当然，也可能因细菌易位而直接产生 SIR、多器官功能障碍以致脓毒症。反复感染无疑将使肠道的组织发生慢性炎症改变，肠功能逐渐丧失。再就是免疫抑制药的应用，引起脂肪与糖代谢的改变，移植肠慢性失功能的标志性改变是因小血管内膜粥样改变、堵塞，肠黏膜萎缩、退变，肠壁肌肉组织纤维化。

为使肠移植能满意地应用于临床，除提高移植技巧、减少移植手术并发症、改进免疫抑制的方法与药物控制急性排斥反应外，如何减少慢性失功能、提高移植物长期有功能成活率，是一重要的研究方向。导致肠移植后慢性失功能是多方面的综合因素，需要各个解决。国际上有人在研究基因的配型、供肠的冷缺血时间等。近年，研究用 Campath1H 诱导免疫抑制、减少 FK506 的用量、免用皮质激素的方法，且逐渐减少 FK506 与激素至完全不用，以达到完全消除 FK506 与激素的副作用。国内在进行应用鱼油以减少血管慢性病变临床研究的动物实验，已取得了初步的效果，但还需经过临床长期应用验证。即使取得成功，也仅是解决了一个问题。还有本身的免疫排斥反应、细菌易位、功能恢复等问题难要借此得以全面解决，有待更多、更深入的研究、探索。

参考文献

Abu-Elmagd K, Costa G, Bond G, et al. 2009. Five hundred intestinal transplantations at a single center: Major advances with new challenges. Ann Surg, 250: 567～581

David Grant. 2009. Intestinal transplant surgery. XIth International Small Dowel Transplant Symposium. Bologna, Italy

Lacaille F, Vass L, Sauvak F. 2008. Long-term outcome growth and digestive function in children 2 to 18 years after intestinal transplantation. Gut, 57: 455～461

Mangus R, Veania R, Tector A. 2009. Intestinal transplantation: an overview. Minerva Chir, 64: 45～57

Mazariegoe GV. 2009. Intestinal transplantation: current outcomes and opporturities. Curr Opin Organ Tranplant, 14: 515～521

Ruiz P, Kato T, Tzakis A. 2007. Current status of transplantation of the small intestine. Tranaplantation, 83: 1～6

撰稿人：黎介寿
南京军区南京总医院

肠屏障功能的早期保护

Early Stage Protection of Intestinal Barrier Function

20 世纪 80 年代对肠功能的认识有一很大的改变，认识到肠道除有消化、吸收与分泌激素的功能外，还具有免疫调节及屏障功能，肠屏障功能的发现是源于烧伤病人的极早期创面尚未出现感染时，血液培养已呈阳性，且为肠道细菌，故最初命名为肠源性感染，后经动物实验，证实细菌确来源于肠道，是由于肠黏膜有缺氧、缺血损害后，肠黏膜的防御功能下降，细菌可从肠腔内通过肠黏膜紧密连接部或直接通过肠黏膜进入淋巴系统、血液或肠壁外。因此，认识到肠道有屏障功能，在正常情况下能阻挡肠内毒素、细菌进入体内，称为“肠屏障功能”(intestinal barrier function)。细菌、毒素通过肠壁进入体内的现象，称为“肠内细菌移位”(intestinal bacterial translocation)。经进一步研究，证实肠屏障功能由机械屏障、免疫屏障与生物屏障组成。机械屏障是指肠黏膜层含黏膜细胞与紧密连接部，免疫屏障主要是淋巴细胞系统与分泌型免疫球蛋白 sIgA 组成，生物屏障包含了消化道特别是胃酸及肠道内的原籍菌（益生菌，probiotics）。肠屏障功能的存在，对机体有着极大的防护作用，减少了机体受到源自肠道细菌的侵害。反之，当肠屏障功能受到损害时，将出现肠道细菌易位，继而出现 SIR、多器官功能障碍以致脓毒症（sepsis），是很多危重患者出现继发性感染的来源，故 Wilmore 称“肠道是机体应激时的中心器官”。Mcfie 更称“肠道是发生多器官功能障碍的发动机”。“肠屏障功能”与“肠道细菌易位”的现象以及相关的病理、免疫与生物分子的研究都在动物实验中获得证实、探索。临床虽无法获得犹如动物实验的结果，但自 20 世纪 80 年代末至今有很多作者报告在人体同样存在着“肠屏障功能”与“肠细菌易位”，虽不能如同动物实验获得直接证据，但在不同的情况下，当肠道的血运、氧供受到障碍时，都可获得“肠细菌易位”的证据，如剖腹探查术、脑外伤、慢性阻塞性肺疾病（COPD）、慢性心衰、肢体外伤、体外循环手术等。因此，如何维护肠屏障功能，减少“细菌易位”，防止继发性感染、多器官功能障碍就成为治疗重症，尤其是危重患者的重要措施。

临床虽已认识到“肠黏膜屏障”存在，已知道维护它的重要性，但是至今仍缺乏有效的指标说明肠黏膜屏障是否受损？维护的措施是否有效？为了证实临床有无肠屏障功能损害，自 20 世纪 80 年代后期，即有如乳糖/甘露醇双糖试验、血液中的内毒素、细菌 DNA、细菌产物、核素标记细菌、肠脂肪酸结合蛋白等

不下十余种测定方法。但都不是早期即能测定得到的结果，多是在病变已明确时始能测定，或是间接说明有肠黏膜损害、细菌易位，甚至是证明肠黏膜的渗透性增加进而推论有细菌易位。而要维护肠黏膜屏障，需在肠黏膜受到循环障碍、氧供不足的极早期阻断损害的发展。因为动物实验证明在肠缺血后再灌注即有障碍功能的损伤。因此，积极防止机体出现缺血、缺氧的状况，是最有效的维护肠功能障碍的措施。这只是理论上的推断，难以在临床实践中完全达到，或者是当有缺血、缺氧的情况出现时，即给予相应的措施，如改善肠道的循环、氧供状况，提供促进肠黏膜细胞修复、增殖的营养物如谷胺酰胺，甚或重组人生长激素等。这些都只能作为普遍的应用，而无明确的针对性，或是当患者再出现缺血、缺氧时起预防性的作用。有实验证明，术前胃肠道给予鱼油，能防止腹部手术导致的肠黏膜缺血再灌注的损伤，起保护肠黏膜屏障的作用，这或可能在有准备的情况下，发挥早期维护肠黏膜屏障的作用。然而，在多数疾病情况下，肠黏膜的缺血再灌注损伤是在无准备的条件下发生。

再者，肠黏膜屏障的损害出现肠道细菌易位，除肠黏膜屏障的功能是否受损外，还有肠道微生态的改变。微生态的改变也是极其复杂的问题，现在临床上为了维护肠道屏障功能，预防肠道细菌易位的发生，除采取保护肠黏膜的措施外，还应用了增添原籍菌（益生菌）、给予选择性肠道去污的制剂（selective digestive disinfection），以期改善肠道内的微生态。但临床应用的结果不一致，距实际情况还有一定的距离，主要是肠黏膜屏障与肠道微生态两者的关系尚未明确。

肠屏障功能早期损害的诊断标志、肠屏障功能损害的机制与调控措施、肠道微生态对肠屏障功能的作用，都需要进一步研究探索，都是研究肠屏障功能早期保护的前提。

参考文献

Li Q, Zhang Q, Wang C, et al. 2009. Alteration of tight junctions in intestinal transplantation induced by Campath-1H. Clinical Immunology, 132: 141～143

Li Q, Zhang Q, Wang C. 2008. Invasion of enteropathogenic *Escherichia coli* into host cells through epithelial tight junctions. FEBS J, 275: 6022～6032

Li Q, Zhang Q, Wang C. 2009. Disruption of tight junctions during polymicrobial sepsis *in vivo*. The Journal of Pathology, 218: 210～221

Li Q, Zhang Q, Wang M, et al. 2008. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha disrupt epithelial barrier function by altering lipid composition in membrane microdomains of tight junction. Clin Immunol, 126: 67～80

Li Q, Zhang Q, Wang M, et al. 2008. n-3 polyunsaturated fatty acids prevent disruption of epithelial barrier function induced by proinflammatory cytokines. Mol Immunol, 45: 1356～1365

Macedo C, Sindhi R, Mazariegos GV, et al. 2005. Sclerosing peritonitis after intestinal transplan-

tation in children. Pediatr Transplant,9:187～191

Qu L, Li Q, Jiang H,et al.2009. Effect of anti-mouse CD52 monoclonal antibody on mouse intestinal intraepithelial lymphocytes. Transplantation,88:766～772

Shen L, Su L, Turner Jr.2009. Machanisms and functional of implication of intestinal defects. Dig Dis,27:443～449

Turner JR.2009. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. Nat Rev Immunol,9:799～809

撰稿人:黎介寿
南京军区南京总医院

胃肠动力的调控

The Regulation of Gastrointestinal Motility

胃肠道分布着平滑肌，具有蠕动的功能，其主要功能是：①胃肠道推进性运动；②胃肠内容物与消化分泌物混合并与肠道吸收面接触；③使某些胃肠道区域具有暂时储存功能，防止内容物从一个部位反流至其他部位；④排出残渣。随着医学的发展，对于胃肠动力的研究逐渐深入到分子和细胞水平，但是胃肠动力的调控机制似乎越来越复杂，而胃肠动力紊乱的发病率却逐渐增高。

现代研究发现，人类胃肠道壁内的神经细胞超过 10 亿个，约与脊髓内神经细胞总数相近。来自中枢神经系统（central nervous system，CNS）的信息，只能被肠壁内的部分神经细胞所接受，兴奋或抑制肠道运动，从而调节胃肠道功能。还有大量胃肠壁内的神经细胞并不直接接受来自 CNS 的冲动。胃肠神经系统内的神经细胞是多种多样的，胃肠道表面分布着丰富的感觉神经末梢，识别机械、化学和温度等刺激，并将刺激转变为神经信息；有的神经细胞则对输入信息进行加工，并向其他神经细胞传递刺激，有的神经细胞能够对该信息做出反应，并传递出相应的调节信息，形成环路，而无需 CNS 的参与。

肠神经系统结构与中枢神经系统相似，例如：①肌间神经丛的神经纤维外无神经束膜和神经内膜等结缔组织包裹，而有神经胶质细胞支持；②分布于肌间神经丛内的神经元及其胞突相互间构成的神经网络，与神经胶质细胞交织在一起；③肌间神经丛内部几乎没有血管，供应神经成分的毛细血管分布在神经胶质鞘之外；④由于肠壁内毛细血管壁较厚，血管内皮细胞间的连接又较密，构成血-肠肌间神经丛屏障；⑤肠神经系统内的神经元有多种类型，它们之间不仅形态结构有显著差别，而且神经递质也多种多样。除了 CNS 所发现的神经递质，目前在肠神经系统已经发现的可能的神经递质还有 5-羟色胺、三磷酸腺苷及多种神经肽。

基于上述研究结果，肠神经系统（enteric nervous system，ENS）的概念逐渐被广泛接受，它是虽然也接受 CNS 调控，但也可进行自我调节、自我控制的功能系统。同时它也接受神经、内分泌、免疫、心理等多种因素的影响，因此，其调控网络复杂，对其调控机制至今仍了解得不多。

动物实验中，应激会抑制胃排空和小肠传输。在人类，恐惧、愤怒、焦虑、痛性刺激和躯体应激均会延缓胃排空和肠道运动，但是应激会刺激结肠运动功能，使得结肠收缩增强，蠕动加快，引起排便和腹泻。

胃肠动力紊乱可分为功能性胃肠病（functional gastrointestinal disorders，FGID）和胃肠动力疾病（disorders of gastrointestinal motility，DGIM）。人们对于有消化系统症状，而应用生化、影像学和内镜检查并未发现有器质性病因的疾病，归之于 FGID。而 DGIM 的基本特点为动力障碍，但有明确的形态学或病理学的改变，如肠神经、平滑肌的变性、退化等。

随着人们生活水平的提高，对健康的重视，胃肠动力障碍性疾病越来越受到重视。目前公布的一项最新统计表明，我国胃肠动力障碍性疾病的患病率为 10%～30%，并且由其所致的就诊病人占消化科门诊的 50%。外科手术也会引起胃肠动力障碍，如术后胃瘫、术后肠麻痹等，也是术后常见的并发症。患者虽然并无器质性疾病基础，但是生活质量受到很大的影响，也占用了大量的医疗资源，也应归属于 FGID 一类。

FGID 是一类独立的临床疾病，以腹痛、腹胀、恶心、呕吐、嗳气、腹泻或便秘等症状为主要临床表现，是一种胃肠感知动力障碍疾病。尽管 FGID 存在部位不同，症状特征各异，但它们在运动和感觉生理及其与 CNS 的关系和治疗方法上仍具有共同特征。

最新的 FGID 诊断标准，仍然只是根据症状来进行诊断，而并无特异性的实验室或影像学等客观检查来加以支持，间接表明我们对其病因了解基本是空白。目前，我们只能说 FGID 的发病并不是简单的功能病，而是胃肠道的中枢和肠道的神经网络及其调控的异常。其发病往往激发一系列程序，而不仅累及单一受体。从某种意义上来说，FGID 在诊断上，尤其是确定有关的发病环节方面有难度，在治疗上也有一定的难度。随着神经胃肠病学的研究进展，人们才意识到 FGID 的症状与许多因素相关，例如动力改变，内脏敏感性增加，黏膜免疫和炎症功能改变，以及 CNS 和 ENS 调节功能改变。内脏高敏感性是 FGID 共同的发病机制，内脏敏感性增高是 FGID 的标志。内脏高敏感性的发生机制较复杂，涉及肠道局部和脑-肠轴的多个方面。

内脏高敏感性可能反映了异常感觉信号传入大脑，也可能是正常信号，却被大脑不恰当地处理，抑或同时存在以上两种机制，从而导致异常的传出信号，并通过脑-肠通路与肠神经系统的联系，影响肠道运动功能。因而，引发功能性胃肠病的环节可源于肠道的异常刺激，例如感染后肠道可导致肠-脑和脑-肠异常的互动，而社会心理因素和精神心理异常对胃肠运动、分泌等功能的影响，也可以引起异常的脑-肠互动。

对于 FGID 患者，感觉运动功能障碍检测的临床价值仍然很有限，主要是因为：①对检查指征无明确规定；②很多方法没有标准化；③症状和功能异常之间的相关性较差；④可供选择的治疗方法很少。而且许多方法费时，相对昂贵，如放射性核素法胃排空和结肠传输时间测定。有的方法有侵入性，如小肠压力测

定、电子恒压器检查等，这些都限制了其在临床的广泛应用。目前，评价消化道感觉的方法并无助于 FGID 的确诊。迄今为止，还不能界定对外界刺激的感觉异常值，无论是通过有意识的感觉，还是测量中枢反应，都难以概括内脏高敏感的特征，这是感觉检查缺乏临床实用性的主要原因。

今后的研究难点，在于能否建立感知-运动与个体症状的相关性；如何完善更具实用性的临床检测和评估胃肠生理功能的方法；进一步完善 FGID 的诊断标准，建立科学规范的治疗方案；开发出更有针对性的胃肠动力药物或者治疗手段，真正造福于广大患者。

参考文献

刘诗，侯晓华 .2006 .胃肠功能性疾病：是胃肠动力障碍？还是内脏感觉异常所致？中华消化杂志，28(8)：568～569

周吕，柯美云 .2005 .神经胃肠病学与动力——基础与临床 .北京：科学出版社

Drossman DA, Corazziari E, Delvaux M, et al .2006 . Rome Ⅲ: The Functional Gastrointestinal Disorders . 3rd ed .McLean, Virginia: Degnon Associates, Inc

Larauche M, Bradesi S, Million M, et al .2008 .Corticotropin-releasing factor type 1 receptor mediate the visceral hyperalgesia induced by repeated psychological stress in rats .Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 294(4): G1033～G1040

撰稿人：秦新裕
复旦大学附属中山医院

供器官来源的短缺

Donor Shortage in Organ Transplantation

目前，器官移植已成为挽救各类脏器终末期功能衰竭患者的唯一有效手段，成为体现一个国家和地区综合医疗水平的重要标志，被誉为"21世纪医学之巅"。全世界已有50余万例身患不治之症的患者通过接受器官移植手术而获得第二次生命，他们过着与正常人一样的生活，生儿育女并且重新走上工作岗位。我国每年有超过100万名患者因肾、肝、心、胰、肺等重要器官功能衰竭需进行器官移植。但每年器官移植手术仅有1.1万例左右，还不到1%，主要原因是供器官来源短缺。大量的器官功能衰竭患者无法及时获得供器官，得不到有效治疗而丧失生命。建立人体器官捐献体系，合理有效利用现有的供器官，研究边缘性供体的应用是解决供器官短缺的方法之一。但是，如何扩大供器官来源仍然是世界移植学界共同关心的问题，异种移植和人工器官的研制或许是有效缓解供器官短缺的途径。供器官短缺问题的解决，将使许多器官功能衰竭患者免除漫长的等待而直接受益于器官移植。人工器官的研制或许将改变器官移植的现状，来源于自身细胞克隆的供器官使移植受者不再需要接受长期免疫抑制剂的治疗。

1. 异种移植

由于同种异体的供器官来源受到限制，我们很早就开始设想是否可以用不同物种的器官来代替人的器官。自1824年Franz Reisinger提出这一设想以来，相关实验一直不断，最早的实验主要集中在角膜移植，如应用鸡、鹅、猪、牛、猴等动物角膜进行异种动物间的实验研究，包括少数应用处理后的鱼角膜等进行急诊人体眼角膜移植手术的报告。Reemtsma等首先报道异种肾移植约20例，供体为黑猩猩、猴、狒狒，存活最长者约9个月，最终患者死于感染而无排斥反应的表现。后来Barnard等施行了异种心脏移植，Starzl等施行了异种肝脏移植。与同种异体移植相比，异种移植的数量和质量均不理想。现在我们仍然需要研究哪种动物的器官功能可与人替换？异种排斥反应是否可以被克服？动物经近交培育后是否可供基因改造？人畜共患疾病是否可以筛检和防治？

目前尚无一种理想的供体动物。黑猩猩、狒狒等非人灵长类动物繁殖困难，数目有限，难以解决供器官不足的根本问题，又牵涉伦理问题，故只能作为异种器官移植的早期实验，难以推广。猪、羊、犬、牛等远缘供者虽与人类亲缘关系较远，但数量多，繁殖费用相对低，可在无病原体条件下培育，较少涉及伦理问

题。因此，从远期目标看，猪是一种相对能接受的供体动物。

对猪进行免疫基因改造，一定程度上能克服异种移植的超急性排斥反应。英国科学家成功地将人 DAF 基因转入猪，使其在猪器官（心、肝、肾、胰、肺等）上表达。美国科学家也已经培育出能表达 CD59 的转基因猪，体外实验证明能减弱人补体的溶猪细胞作用。用基因敲除法使猪半乳糖基转移酶基因失活，减少和阻止细胞表面 $\alpha_{1\sim3}$ Gal 表达，可以减少异种抗原的表达。从猪主动脉内皮细胞中分离出 NF-κB 的抑制基因，将该抑制基因置于启动子下游，则可能阻止内皮细胞的活化。科学家通过基因改造，增加了人体移植猪器官的可行性，从而有望解决供器官不足的问题。目前的技术只敲除了两个排斥基因中的一个，因此猪器官移植到人体内还是会发生强烈的排斥反应。但是，即使只敲除猪体内的一个基因，也是基因科技的巨大成就，可以算是科学家利用人工技术在器官移植领域的一项尝试。

为了防止人畜共患疾病的发生，我们还应该对供体猪进行疾病调查，在无致病原环境中或按无菌动物标准繁育供体猪，使其不携带对人体有害的致病原。

2. 人造器官

由于异种移植尚未取得理想的疗效，科学家们同时开始研究和制造各种不同材质的“人造器官”。目前日本在利用纳米技术研究人造器官，英国在研制人造纤维肺，还有科学家用透明的医用高分子材料制成特殊光学装置的人工角膜及钛金属人造心脏等。

目前科学家可以利用组织工程学技术，用自体细胞在实验室培育出组织器官，比人工材料制造的器官更胜一筹。自体细胞培育的“人造器官”不但有望解决器官短缺问题，而且移植后不会发生排斥反应，不需要辅助药物治疗，不涉及伦理问题。采用生物制造方法获取人工器官，就成为取代同种和异种器官移植以及机电式人工器官植入的具有很大发展潜力的方法。

实现组织器官的再造，需种子细胞、生物材料及组织构建这三大要素，主要是建立由细胞和生物材料构成的三维空间复合体，能形成具有生命力的活体组织，对病损组织进行形态、结构和功能的重建并达到永久性替代。然而组织工程学有几个难题亟待解决，诸如如何获得可靠的种子细胞、寻找适合的易降解的生物材料、构建大体积组织或器官的血供问题、完善的体外培养系统等。种子细胞是生物工程的核心，目前研究得最多的是干细胞，其可以分化成所有功能的细胞。目前已经制造出部分人造组织和器官，并正在逐步商品化，比如人造皮肤（命名为“Apligraf”）、软骨、人造膀胱等。美国科学家还成功地将再生膀胱移植到了患者体内。美国 FDA 为了保证组织工程产品的安全有效，专门成立了组织工程产品标准委员会。组织工程学是一门新兴的学科，但前景广阔，发展迅速，为人工器官的制造提供了可能。

目前的组织工程技术比较简单和原始，只适用于修复简单组织器官的缺损，无法实现修复和替换复杂器官的目的。由于人造器官不仅要解决神经支配和血液供应的问题，还要保证器官受大脑支配，肌肉可以收缩。像肝脏这样的人体器官，有几十种细胞，而且细胞功能复杂，目前的技术仍无法复制。因此，必须寻找到更好的方法来制造具有生物活性的组织和器官，从根本上解决组织和器官的来源匮乏问题。

英国科学家在成功克隆羊以后，为保持其世界领先水平，政府宣布在全国范围内允许以治疗为目的的人体胚胎克隆实验。纽卡斯尔大学研究人员最近首次成功利用从婴儿脐带血中提取的干细胞培育出人类肝脏组织，造出一个直径不超过2.5cm的“迷你肝”。美国生物学家诺贝尔奖获得者吉尔伯特认为：用不了50年，人类将能够培育出人体的所有器官。世界器官移植大会提出，克隆人类早期胚胎，比基因工程更方便。设想今后在人刚降生时，取其脐带血和胚胎血冷冻起来，必要时从中提取细胞，克隆出早期胚胎，再从胚胎中提取未完全发育的干细胞，培养出他本人所需要的组织或器官，用来替换本人已衰老或失用的器官。进一步，用相同的方法亦可从成人组织细胞中克隆出组织或器官，用于器官移植。今天的研究和设想，在不久的明天都将成为现实，器官移植将造福于更多的患者。

参考文献

Atala A. 2009. Engineering organs. Curr Opin Biotechnol, 20(5): 575～592

Mammoto T, Ingber DE. 2010. Mechanical control of tissue and organ development. Development, 137(9): 1407～1420

Pierson RN, Dorling A, Ayares D, et al. 2009. Current status of xenotransplantation and prospects for clinical application. Xenotransplantation, 16(5): 263～280

Reemtsma K. 1969. Renal heterotransplantation from nonhuman primates to man. Ann N Y Acad Sci, 162(1): 412～418

Rosengard AM, Cary NR, Langford GA, et al. 1995. Tissue expression of human complement inhibitor, decay-accelerating factor, in transgenic pigs. A potential approach for preventing xenograft rejection. Transplantation, 59(9): 1325～1333

Taylor DA. 2009. From stem cells and cadaveric matrix to engineered organs. Curr Opin Biotechnol, 20(5): 598～605

Theoret C. 2009. Tissue engineering in wound repair: the three “R”s—repair, replace, regenerate. Vet Surg, 38(8): 905～913

撰稿人：郑树森　吴　健
浙江大学医学院附属第一医院

探索原发性肝癌的分子标志物

The Exploring of the Molecular Biomakers of Primary Liver Cancer

原发性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一，死亡率仅次于胃癌、食管癌。世界胃肠病组织全球指南显示，全世界每年有超过 60 万人死于肝癌，其中至少 50% 发生在中国。原发性肝癌可分为肝细胞型、胆管细胞型和混合型三种类型，其中肝细胞肝癌（以下简称肝癌）占 90% 以上。对肝癌临床诊断的延误和缺乏对复发的有效监测是影响患者生存的主要因素。为了有效地治疗肝癌，提高手术切除率和无瘤生存率，肿瘤的早期诊断是最重要的前提。近几十年来，科学家通过大量的研究，在分子水平寻找体内可能的肿瘤痕迹，临床上把这种痕迹称作"肿瘤的分子标志物"。因此，发现灵敏度和特异性高的肿瘤分子标志物成为促进肝癌早期诊断、合理治疗、预后评估及复发监测的关键。

甲胎蛋白（alpha fetal protein，AFP）是胚胎时期肝细胞合成的一种特殊糖蛋白，是目前临床应用最广泛的肝癌特异标志物。最常用的定量试验（放射免疫法）参考值为 0～25μg/L。AFP 阳性的发现有时甚至比影像学检查阳性要早数月至 1 年左右，这能为病人赢得宝贵的治疗时间。在排除活动性肝病、生殖腺胚胎瘤和妊娠的情况下，若 AFP 定量＞400ng/ml 持续 4 周，或＞200ng/ml 持续 8 周，则可诊断肝癌。在肝癌中，约 70% 的患者 AFP 呈阳性，通常 AFP 的血清浓度与肿瘤的大小及肿瘤细胞的分化程度有一定相关性。因此，临床上不仅可将其用于肝癌早期诊断，同时也可用于肝癌根治术和介入手术（如 TACE 术）治疗后复发情况的评估。近年文献显示，AFP 水平是影响肝癌肝移植患者预后的重要因素，也可有效监测肝移植术后肝癌复发转移。因而，AFP 已作为一项重要参数被纳入肝癌肝移植的准入标准中。例如，"杭州标准" 具体内容包括：①无大血管侵犯；②肿瘤总直径≤8cm 或大于 8cm，但术前 AFP≤400ng/ml 且组织学分级为高/中分化。

根据 AFP 与小扁豆凝集素（LCA）的亲和力不同，AFP 可分为三种异质体：AFP-L1（来自良性肝病，AFP 主要成分）、AFP-L2（来自孕妇）、AFP-L3（来自肝癌细胞）。AFP-L3 与肝癌的肿瘤数目、分化级别和浸润程度等密切相关，对小肝癌有很高的特异性，其在 AFP 中所占比例（临界值为 10%～15%）是肝癌早期诊断、治疗方案选择、疗效评定及复发监测的有价值指标。

然而，近 1/3 的肝癌患者 AFP 呈阴性，近年来血清 AFP 阴性的肝癌有增多趋势。因此，开发更新、更特异、更敏感的标志物已迫在眉睫，寻找癌胚特性的

同工酶及异质体，寻找特异亚组成成分是当前肝癌血清标志物研究的方向。目前国内外学者利用系统生物学方法，结合基因芯片、蛋白质组学等技术，从基因突变、肿瘤相关蛋白、表观遗传学、非编码微小 RNA 等方向入手，发现了一系列肝癌相关的血清标志物（表 1）。

表 1　目前已发现的部分肝癌分子标志物

分子标志物	成分	肝癌相关特性
异常凝血酶原（DCP）	糖蛋白	DCP 敏感性和特异性高于 AFP，且是肝癌患者血管侵犯的有价值指标
α-*L*-岩藻糖苷酶（AFU）	酶	高表达于肝癌细胞膜表面，而癌旁组织未见表达。AFU 活性与肝癌大小无关，对 AFP 阴性的肝癌诊断更有意义
磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3（GPC3）	蛋白聚糖	与肿瘤的大小和分化程度有关。与肝癌患者 AFP 水平无相关性。与 AFP 结合应用能增加肝癌诊断的敏感性而不影响其特异性
鳞状细胞癌抗原（SCCA）	糖蛋白	在肝癌患者组织及血清中过表达，敏感性高（84%）而特异性低（49%），同时高表达于头颈癌及其他上皮癌组织中
人高尔基蛋白 73（GP73）	跨膜蛋白	在具有肝硬化背景的早期肝癌中敏感性高于 AFP（62% vs. 25%），约 57% 的 AFP 阴性的肝癌患者血清 GP73 升高
热休克蛋白 70（HSP70）	热休克蛋白	是肝癌早期鉴别诊断的灵敏标志物之一，早期肝癌过度表达明显高于癌前病变，而进展期肝癌显著高于早期肝癌
肝细胞生长因子（HGF）	生长因子	在肝癌患者中表达水平显著高于肝硬化或慢性肝炎
转化生长因子-β_1（TGF-β_1）	生长因子	在肝癌患者中表达水平显著高于非肝癌慢性肝病患者，其表达与肝癌分化相关
基质金属蛋白酶（MMP）	酶	血清 MMP-9/MMP-2 比率可作为乙肝相关性肝癌的辅助诊断标志物，在鉴别早期和进展期肝癌中发挥作用
磷酸变位酶 1（PGAM1）	酶	与分化程度差的肝癌和患者生存降低有关，可作为诊断标志物和肝癌治疗靶点
β_2-微球蛋白（β_2-microglob-lin）	微球蛋白	可能作为早期影像学未见的肝癌的一个诊断标志物
Yes 相关蛋白（YAP）	蛋白	是肝癌患者总生存和无瘤生存时间的独立预后标志物，与组织学分化和血清 AFP 水平相关，是肝癌的潜在治疗靶点
转移抑制基因 23（nm23）	基因	人类 nm23 基因有 nm23-H_1 和 nm23-H_2 两种亚型，nm23-H_1表达水平与肝癌细胞转移能力呈负相关
转录子 AA454543（tran-script AA454543）	基因	肝癌组织高水平的 AA454543 与血管浸润等恶性肿瘤特征及不良预后相关，术前血浆中 AA454543 水平是总生存的独立危险因素，与肝癌患者肝切除术后的预后相关
微小 RNA（microRNA）	非编码 RNA	在肝癌中异常表达，与肝癌发生和进展相关，逐渐成为肝癌诊断和预后相关的新的标志物，可用来评估肝癌风险，协助肝癌诊断和辅助治疗

除以上分子标志物外，最近还发现一些肝癌标志物如泛素C末端水解酶L1、核纤层蛋白、钙黏素-17、波形蛋白等，但这些分子标志物的应用远不如AFP广泛。目前探索原发性肝癌的分子标志物的局限性在于：①无论在早期诊断还是复发转移的监测方面，上述一些分子标志物具有一定的灵敏度，但普遍缺乏特异性；②缺乏对不同分子分型肝癌的筛选诊断；③不足以准确评估预后和提供复发转移的预警；④不能指导临床治疗方案的合理选择。

肝癌的发病率在世界范围内仍然不断上升。随着分子生物学、人类基因组学、蛋白质组学的不断发展，对肝癌的研究已不再局限于少数几个基因或者蛋白质，如血清多肽芯片技术、miRNA 微阵列、生物质谱等技术的迅速发展都为探讨肝癌这类多基因、多蛋白参与的复杂过程开辟了新的领域。尽管肝癌血清标志物众多，但每种标志物的敏感性、特异性都是有限的。即使联合检测几种肝癌血清标志物可以优势互补，提高诊断效率，但其作用仍然有限。大量文献表明，从基因水平诊断肝癌，通过检测外周血中的分子标志物，可提高肝癌的早期诊断率，并早期评估肝癌细胞血行播散、术后复发及转移风险。同时，肝癌的肿瘤标志物检测需要突破定性诊断的局限性，在临床应用时需结合临床表现、影像学检查及组织学检查进行综合评判。综合考虑，未来理想的肿瘤标志物应达到以下要求：①是一种分泌蛋白或核酸产物，应具有临床易检测性；②在早期诊断肝癌方面，具有较高的敏感性和特异性；③反映肿瘤的病理特征和恶性生物学行为，如血管侵犯、肺和骨的转移、淋巴结转移等信息；④评估肝癌外科手术、介入治疗、肝移植及靶向药物的治疗效果，反映肝癌对不同治疗手段的敏感性；⑤监测肿瘤的复发和转移。因此，寻找新的分子标志物并对其进行有效组合，获得临床模型，进一步提高检测的灵敏度和特异度，这对早期诊断肝癌、指导治疗、预后评估及预警转移复发具有重要的临床意义。

参考文献

Cheung ST, Liu CL, Chow JP, et al. 2006. Preoperative plasma transcript AA454543 level is an independent prognostic factor for hepatocellular carcinoma after partial hepatectomy. Neoplasia, 8(9): 696～701

Grizzi F, Franceschini B, Hamrick C, et al. 2007. Usefulness of cancer-testis antigens as biomarkers for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. J Transl Med, 5: 3

Ji J, Wang XW. 2009. New kids on the block: diagnostic and prognostic microRNAs in hepatocellular carcinoma. Cancer Biol Ther, 8(18): 1686～1693

Li C, Qian J, Lin JS. 2006. Purification and characterization of α-*L*-fucosidase from human primary hepatocarcinoma tissue. World J Gastroenterol, 12(23): 3770～3775

Roberta WC, Pang PD, Jae WJ, et al. 2008. Biology of hepatocellular carcinoma. Annals of Surgical Oncology, 15(4): 962～971

Saito Y, Oba N, Nishinakagawa S, et al. 2010. Identification of beta2-microglobulin as a candidate for early diagnosis of imaging-invisible hepatocellular carcinoma in patient with liver cirrhosis. Oncol Rep, 23(5): 1325～1330

Shirabe K, Itoh S, Yoshizumi T, et al. 2007. The predictors of microvascular invasion in candidates for liver transplantation with hepatocellular carcinoma-with special reference to the serum levels of des-gamma-carboxy prothrombin. J Surg Oncol, 95: 235～240

Toyoda H, Kumada T, Kiriyama S, et al. 2006. Prognostic significance of simultaneous measurement of three tumor markers in patients with hepatocellular carcinoma. Clin Gastroenterol Hepatol, 4(1): 111～117

Yeh HC, Lin SM, Chen MF, et al. 2010. Evaluation of serum matrix metalloproteinase (MMP)-9 to MMP-2 ratio as a biomarker in hepatocellular carcinoma. Hepatogastroenterology, 57(97): 98～102

撰稿人：郑树森　徐　骁

浙江大学医学院附属第一医院

肝脏移植免疫耐受现象的机制

Mechanism of Immune Tolerance in Liver Transplantation

有关肝移植后发生自发耐受的现象一直是学术界研究的热点。早在 20 世纪 70 年代 Clane 就首先报道了他在猪肝移植中发现的这种奇特现象。随后，在小鼠和某些大鼠肝移植中也得到验证，从而使得肝脏获得了“免疫特惠器官”的称谓。Lee 等发现肝脏能对联合移植器官起免疫保护作用，不同品系的近交系小鼠间可跨越 MHC 的限制，实现对肝脏移植物的自发耐受，临床研究发现，肝脏移植的急性排斥程度较其他器官（肾脏、心脏、皮肤和胰腺等）轻，也由此逐渐发现了肝脏免疫反应不同于其他移植器官的特性：一方面自身排斥反应小，另一方面它可诱导受者对供者其他易排斥的器官产生免疫耐受，对相同起源的其他移植物起保护作用，提示肝脏移植后具有自发免疫耐受的特性。

肝移植免疫耐受可能是免疫学因素和非免疫学因素共同作用的结果。

（1）与解剖学及生理学因素有关：肝脏体积较大，有双重血液供应。肝脏血管的结构十分特殊，肝脏实质细胞和内皮细胞间没有基膜相隔，上皮屏障由肝血窦内皮细胞构成，该细胞连接不紧密，细胞间隙较大，使得 T 细胞易与肝实质细胞相互接触和作用，可以耐受宿主免疫系统的攻击。此外，肝脏具有良好的再生修复能力，这也被认为与自发免疫耐受有关。

（2）可溶性主要组织相容性抗原复合物Ⅰ：人体血液循环中有一半的 MHC-Ⅰ及全部的 sMHC-Ⅰ都是在肝脏内由肝实质细胞合成。肝移植术后，供体肝脏可以产生大量的 sMHC-Ⅰ。sMHC-Ⅰ在体内或体外均可诱导细胞毒性 $CD8^+$ T 细胞的凋亡。转染供体可溶性分子基因的受体肝细胞也可以降低细胞毒性 T 细胞的活性，延长移植存活时间。有研究证实，经静脉注射供体 sMHC-Ⅰ可使移植物存活时间延长。提示 sMHC-Ⅰ可能和肝移植免疫耐受的诱导密切相关。

（3）T 细胞的克隆清除：由于活化的浸润 T 淋巴细胞是排斥反应的主要效应细胞，所以活化淋巴细胞的凋亡有助于受体产生免疫耐受。Clouston 等通过临床肝移植后肝穿刺活检发现，肝窦及汇管区有大量淋巴细胞凋亡，提示肝脏内淋巴细胞凋亡是肝移植自发耐受的重要原因。研究发现，肝脏内 T 细胞凋亡与清除主要与 Fas/FasL 途径，以及 TNF/TNF 受体等死亡供受体的结合有关。另一方面，抗原低表达，或是 IL-10、TGF-β 等生长因子分泌减少所致效应性 T 细胞克隆增殖障碍导致被动 T 细胞凋亡。这可能是肝移植免疫耐受的机制之一。

另外，近年的研究发现，参与肝脏移植免疫耐受的机制是多方面的，有些机制是其他器官移植免疫耐受产生所共有的，但肝脏非实质细胞诱导肝移植后免疫耐受的作用却是肝脏免疫耐受中特有的。随着研究的进一步深入，肝内非实质细胞的地位越来越受到重视。肝脏内的非实质细胞包括树突状细胞、库普弗细胞、肝窦内皮细胞等；它们均具有一些共同的特点，如具有抗原提呈细胞的特性，其表面都表达 MHC-Ⅰ、MHC-Ⅱ、CD80、CD86 及 CD40 等分子，都被证实能诱导肝移植免疫耐受。

(1) 微嵌合现象及树突细胞（DC）：微嵌合现象最先由 Starzl 于 1969 年发现，通过对长期存活的肝移植病人进行研究发现，受体接受供肝后，肝细胞和肝主要血管内皮保留了供体特征而整个巨噬细胞系统，包括库普弗细胞，为受体细胞所取代，同时在受体中持续发现供体特异性的免疫球蛋白类型和红细胞同种抗体。由此提出了有关移植物接受的细胞迁移学说为供体与受体之间的细胞迁移能导致移植肝最终被接受与产生微嵌合现象有关，肝移植后供者细胞大量向受者器官组织内迁移，与受者细胞共处，被受者视为“自我”从而产生耐受。而 DC 是形成微嵌合体的主要细胞，DC 也是最重要的抗原提呈细胞，在启动免疫反应效应器方面非常重要。

(2) 库普弗细胞（KC）：KC 在肝非实质细胞中数量占 20% 左右，与肝移植免疫耐受密切相关。①直接与血液中的 T 细胞相互作用，抑制 T 细胞的增殖；②研究发现，KC 还表达有功能型 FasL，可通过 Fas/FasL 途径诱导效应性 T 细胞凋亡；③KC 可以分泌 IL-10，诱导 Th2 类细胞的产生；④KC 表面低表达 DC80、CD86 等共刺激分子，对于诱导 T 细胞无能有一定的作用。

(3) 肝细胞：较其他器官的实质细胞，肝细胞具有独特的抗原提呈功能。静止期肝细胞不表达 MHC-Ⅱ、CD40L、CD80 等分子，这十分有利于诱导肝移植免疫耐受的形成，经过供体肝细胞预处理后可以延长移植物的存活时间。因此，肝细胞本身也可能参与了肝移植免疫耐受的诱导。

(4) 肝窦内皮细胞（LSEC）：是唯一具有抗原提呈功能的内皮细胞，其直接与受体淋巴细胞接触，能交叉提呈可溶性外源抗原给 $CD8^+$ T 细胞，诱导 $CD4^+$ T 细胞分化为调节性 T（Treg）细胞，后者可通过以下途径介导抑制作用：①Treg细胞活化后其膜表面的 TGF-β 与靶细胞表面的 TGF-β 受体结合；②其表面表达的 CTLA-4 也可与 CD80、CD86 结合；③释放 IL-10、TGF-β 等细胞因子，抑制 APC 的抗原提呈和效应性 T 细胞的活化。

(5) 肝星状细胞亦可通过 Fas/FasL 途径及 B7-H1 途径介导 T 细胞凋亡；肝星状细胞可促使 Th2/Th3 型细胞因子分泌增加；通过酪氨酸磷酸化信号通路水平 76kDa 蛋白的变化来实现介导 T 细胞凋亡。

从外周免疫细胞来看，近年来 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞在移植免疫中的作用

受到广泛关注。$CD4^+CD25^+$ Treg 细胞是天然产生的 Treg 细胞的主要亚群之一，在自身免疫环境的稳定中发挥重要作用。Walsh 等在自发耐受的同种异体肝移植动物模型中发现，移植后第 2 天汇管区出现明显的淋巴细胞浸润，于第 7 天达到高峰，浸润的主要是 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ Treg 细胞，$CD25^+$ 的 T 细胞比例明显增加，提示 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞可能参与了自发免疫耐受的诱导。但有关 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞分化发育的具体机制仍不清楚。最近 Hori 等在《Science》上阐述了 Foxp3（forkheadboxp3）与 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞的关系。Foxp3 特异性地表达于 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞上，且在该细胞的发育和功能维持上起了很重要的作用，提示 Foxp3 可能是 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞的一个特征性标志。

随着该领域研究的逐步深入，近年来一些新的研究思路也开始逐渐融入其中，比如有相关研究表明肥大细胞可能通过某种方式下调 Treg 细胞的功能从而诱导已产生免疫耐受的组织发生排斥反应，在此之前肥大细胞一般被认为只与过敏反应等病理过程有关；此外，随着各种传统中药单体分子提纯技术的逐步完善，传承了数千年的中国草药医学也日益受到国内外免疫学专家的注意，众多研究表明一些中药单体分子对肝脏免疫具有双向调节作用，并且兼具了低价、安全等优势，是一个极具有发展前景的研究方向。可以预见，分子生物学、植物药理学、组织工程学的不断融入将给肝脏免疫研究领域注入新的生机。在基础和临床肝脏移植免疫学研究中进一步诠释肝脏自发免疫耐受，根据其机制研究相应的免疫耐受诱导方式，最终必将能使临床肝脏移植的免疫耐受成为可能。

参考文献

Fontenot JD ,Gavin MA ,Rudensky AY .2008 . Foxp3 programs the development and function of $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells .Nat Immunol ,4(4):330～336

Franceschini D , Paroli M , Francavilla V ,et al . 2009 . PD-L1 negatively regulates $CD4^+CD25^+$ $Foxp3^+$ Tregs by limiting STAT-5 phosphorylation in patients chronically infected with HCV . J Clin Invest ,119 :551～564

Huber S , Schramm C , Lehr HA ,et al . 2004 .Cutting edge:TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory $CD4^+CD25^+$ T cells . J Immunol ,173 :6526～6531

Jiang G , Yang HR , Wang L ,et al . 2008 .Hepatic stellate cells preferentially expand allogeneic $CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$ regulatory T cells in an IL-2-dependent manner .Transplantation ,86 : 1492～1502

Reding R , Gras J , Truong DQ ,et al .2006 . The immunological monitoring of alloreactive responses in liver transplant recipients : a review .Liver Transpl ,12(3):373～383

Sakaguchi S , Miyara M ,Costantino CM ,et al .2010 .$Foxp3^+$ regulatory T cells in the human immune system .Nat Rev Immunol ,10(7):490～500

Tiegs G ,Lohse AW .2010 . Immune tolerance : what is unique about the liver . J Autoimmun ,34 (1) :1～6

Wiegard C , Frenzel C , Herkel J ,et al . 2005 .Murine liver antigen presenting cells control suppressor activity of $CD4^{+}$ $CD25^{+}$ regulatory T cells .Hepatology ,42 :193～199

You Q , Cheng L , Kedl RM ,et al .2008 . Mechanism of T cell tolerance induction by murine hepatic Kupffer cells . Hepatology ,48 :978～990

撰稿人 :郑树森　严　盛
浙江大学医学院附属第一医院

提高肝门部胆管癌患者的存活率

Improvement of Hilar Cholangiocarcinoma Survival

肝门部胆管癌是一种侵及胆囊管开口以上肝总管至左右肝管汇合部并向两侧肝内胆管浸润的胆管癌。1957 年 Altemeier 首先描述该肿瘤，1965 年 Klatskin 首先定义其临床特征，因此肝门部胆管癌又被称为“Klatskin tumor”。肝门部胆管癌可沿胆管壁浸润生长，往往没有包膜，且因其发生的解剖位置毗邻第一肝门，肿瘤易累及门静脉、肝动脉及肝实质，为根治性治疗带来困难。

当前，肝门部胆管癌的治疗首选手术切除。肝门胆管癌往往可根据 Bismuth-Corlette 分型（图 1）选择手术方式：Ⅰ型和Ⅱ型可行肝外胆管、胆囊切除，区域淋巴结清扫，肝胆管空肠 Roux-en-Y 吻合术；Ⅲ型在上述手术基础上附加右或左肝叶切除；Ⅳ型以上手术加扩大右或左半肝切除；原则是切断胆管距肿瘤边缘 5mm，且术中冰冻切片无肿瘤残余；Ⅱ型及Ⅲ型常侵及肝尾状叶，宜同时切除尾状叶。与其他肝脏手术相似，肝门部胆管癌手术也面临剩余肝脏是否能够维持身体正常生理需要、肿瘤切缘阳性率等问题。同时，由于肝门部胆管癌侵犯第一肝门，是胆管、门静脉、肝动脉进入肝脏的门户，导致上述问题更为棘手。可能因一枚直径小于 5cm 的肿瘤而需切除左半肝或者右半肝，并且进行大范围肝脏切除后仍然不能保证切缘无肿瘤残留。伴随肝脏外科技术的飞速发展，肝门部胆管癌的手术切除率亦获得明显提高。根据文献报道，目前肝门部胆管癌切除率为 50% ～70%，但值得指出的是，手术切缘阳性率高达 20% ～40%，即有相当部分接受手术治疗的患者存在肿瘤残留。术后肿瘤复发率更令人失望，高达 50% ～70%，中位无瘤存活时间仅为 12～43 个月，根治性切除后 5 年存活率为 25% ～40%。

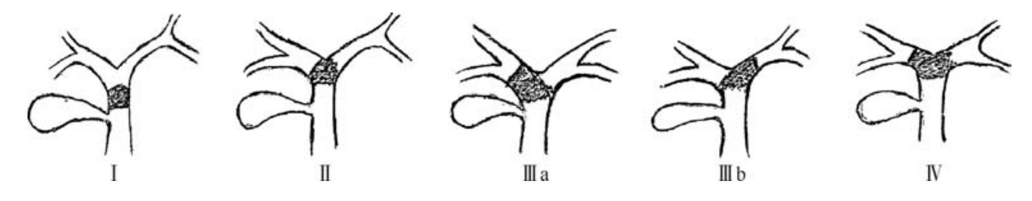


图 1 Bismuth-Corlette 分型示意图

提高肝门部胆管癌存活率的最大难点在于严重缺乏非手术的肿瘤治疗手段。肝门部胆管癌对化疗、放疗均不敏感，虽多个中心曾经提出多种组合的化疗、放

疗方案，但疗效均不理想。患者一旦临床诊断为肝门部胆管癌就立即评估是否可以接受手术，缺乏与手术相辅相成的其他肿瘤治疗有效手段。对于不能行手术切除治疗的患者多数只能接受减黄姑息治疗，即通过放置支架、放置导管等暂时使得胆汁能够排出肝脏，降低黄疸水平，在一段时间内改善生活质量，却放任肿瘤的不断生长、扩散。即使手术切除后病理报告提示切缘阳性，也难以采取进一步措施杀灭残余肿瘤。术后发现肿瘤复发，由于部分患者已经接受左半肝或者右半肝切除术，剩余肝脏体积较少，往往难以接受再次手术，复发后治疗措施也严重匮乏。建立和完善肝门部胆管癌的综合治疗体系，对于不能切除的患者，在减黄、改善生活质量、延长等待时间的同时，通过降期治疗缩小肿瘤体积和侵犯范围，获得手术机会，提高手术切除率；对于术后尤其是病理检查发现切缘阳性的患者，采取辅助治疗，杀灭残余肿瘤，预防和延缓肿瘤复发；对于术后肿瘤复发患者，进行进一步治疗，抑制肿瘤生长，延长存活时间。这对于提高肝门部胆管癌患者存活率、降低术后复发率、改善生活质量无疑具有重大意义。

解决上述难题必须解除化疗、放疗等常规治疗手段的束缚，探索新型治疗方法。肝移植在肝门部胆管癌中的作用应获得重视。虽然国内外数据均表明，胆管细胞癌行肝移植后存活率较肝细胞癌及良性疾病均低，但亦有研究指出肝移植治疗肝门部胆管癌较手术切除明显延长存活时间。甚至有学者提出应用多器官联合移植治疗肝门部胆管癌的观点。尤其对于肝门部胆管癌合并原发性硬化性胆管炎（primary sclerosing cholangitis，PSC）的患者，常规手术治疗在切除肿瘤后难以治愈原发性硬化性胆管炎，仍面临高术后并发症发生率和难治性黄疸问题。并且该类患者的肝内胆管呈现弥漫性硬化性病变，手术、支架置入、导管置入等都难以将淤积在硬化胆管内的胆汁引流出来，黄疸仍然可呈现不断上升趋势，导致患者生活质量极差，并且短期内发生肝功能衰竭。肝移植可在移除肿瘤的同时，切除病变的肝脏，并移植进入健康肝脏，较常规手术具有明显优势。光动力治疗（photodynamic therapy，PDT）是一种通过光敏物质退激、生成活性氧、损伤细胞结构的治疗方法。研究发现，光动力治疗可以延长不可切除胆管癌患者的存活时间，但仍有待随机双盲大规模临床试验的进一步认证和评估。

解决肝门部胆管癌综合治疗难题的一个可行思路是发展放射免疫靶向治疗，筛选与肝门部胆管癌侵袭、转移密切相关的癌标志物和药靶，通过分子生物学技术，构建特异性单抗，封闭肝门部胆管癌侵袭、转移相关抗原，抑制肿瘤生长、侵袭和转移，并结合放射治疗，靶向针对肿瘤细胞、直接杀灭癌细胞。近年来，分子靶向治疗（molecular targeted therapy）进展明显，相关药物不断研发和应用，是当前肿瘤治疗研究的热点之一。既往研究已经发现，肝门部胆管癌可能与 iNOS 介导的 Notch-1 表达提高等机制有关。研发肝门部胆管癌相关的分子靶向治疗药物，阻断肿瘤相关信号转导通路，抑制肿瘤血管生长、信号转导等，从而

导致肿瘤坏死，是肝门部胆管癌治疗领域突破的方向之一。

参 考 文 献

Dumoulin FL, Gerhardt T, Fuchs S, et al. 2003. Phase Ⅱ study of photodynamic therapy and metal stent as palliative treatment for nonresectable hilar cholangiocarcinoma. Gastrointest Endosc, 57(7): 860～867

Heimbach JK, Gores GJ, Haddock MG, et al. 2006. Predictors of disease recurrence following neoadjuvant chemoradiotherapy and liver transplantation for unresectable perihilar cholangiocarcinoma. Transplantation, 82(12): 1703～1707

Ito F, Agni R, Rettammel RJ, et al. 2008. Resection of hilar cholangiocarcinoma: concomitant liver resection decreases hepatic recurrence. Ann Surg, 248(2): 273～279

Ito F, Cho CS, Rikkers LF, et al. 2009. Hilar cholangiocarcinoma: current management. Ann Surg, 250(2): 210～218

Kondo S, Hirano S, Ambo Y, et al. 2004. Forty consecutive resections of hilar cholangiocarcinoma with no postoperative mortality and no positive ductal margins: results of a prospective study. Ann Surg, 240(1): 95～101

Robles R, Figueras J, Turrion VS, et al. 2004. Spanish experience in liver transplantation for hilar and peripheral cholangiocarcinoma. Ann Surg, 239(2): 265～271

Shimoda M, Farmer DG, Colquhoun SD, et al. 2001. Liver transplantation for cholangiocellular carcinoma: analysis of a single-center experience and review of the literature. Liver Transpl, 7(12): 1023～1033

Takada T, Amano H, Yasuda H, et al. 2002. Is postoperative adjuvant chemotherapy useful for gallbladder carcinoma? A phase Ⅲ multicenter prospective randomized controlled trial in patients with resected pancreaticobiliary carcinoma. Cancer, 95(8): 1685～1695

撰稿人：郑树森　胡振华
浙江大学医学院附属第一医院

逆转乳腺癌化疗耐药

Reversing the Multidrug Resistance of Breast Cancer

乳腺癌是全世界范围内女性最常见的恶性肿瘤，占全部恶性肿瘤的 23%，每年有超过 100 万例的新增病例。据资料统计，2000～2005 年，我国女性乳腺癌的发病人数增长了 38.5%，死亡人数增加了 37.1%，已跃居女性恶性肿瘤的第一位，严重影响了我国女性的健康。

如此严峻的形势要求我们必须努力提高乳腺癌的治愈率及改善患者生活质量。目前，乳腺癌已被公认为是一种全身性的恶性疾病，其治疗重心也从以手术治疗为主的治疗模式转移到以全身治疗为主的综合治疗模式。其中，全身化疗在乳腺癌的综合治疗中占据着举足轻重的地位。乳腺癌是对化疗比较敏感的实体瘤之一，随着各种化疗药物的开发使用和化疗方案的不断优化，许多乳腺癌患者从中获益，总生存率得到不断提高。但是，与此同时，乳腺癌化疗的内源性或获得性的耐药现象也愈加普遍，并成为化疗失败的主要原因之一。如多柔比星是浸润性乳腺癌治疗中具有里程碑意义的化疗药物，但仍有大约 50% 的患者对这种药不敏感。因此，化疗耐药成为乳腺癌治疗中突出的难题。只有解决这一难题，才能最大限度地发挥化疗效果并减少对患者机体的无谓损害，有效提高乳腺癌的总体生存率。

解决乳腺癌化疗耐药难题，首先需要对乳腺癌多药耐受（multidrug resistance，MDR）机制进行深入研究。近年来的研究陆续揭示，肿瘤产生耐药的分子机制与肿瘤细胞特定的基因表达有密切关系，而且是一个多因素多环节的过程。主要包括四个方面：①跨膜转运泵基因的扩增或过表达。当此类基因过表达时，使肿瘤跨膜蛋白表达异常，通过主动外排药物或影响药物的核质分布，减少肿瘤细胞核内的药物浓度而产生耐药。其中以 P-糖蛋白（P-gp）最重要，最近还发现一些分子如多耐药相关蛋白（MRP）、肺耐药相关蛋白（LRP）、乳腺癌耐药相关蛋白（BCRP）也与耐药有关。②谷胱甘肽-*S*-转移酶 π 亚型（GST-π）过表达或活性增加。谷胱甘肽-*S*-转移酶（GST）是一类多基因家族，其中 π 亚型与乳腺癌的关系最为密切。GST 能够催化体内亲电性化合物与谷胱甘肽结合，使有毒化合物增加水溶性，有利于排出体外。即通过增强化学药物的代谢产生耐药。③核酶 DNA 拓扑异构酶Ⅱ（TOPO-Ⅱ）含量减少或性质改变。肿瘤细胞内 TOPO-Ⅱ水平直接影响 TOPO-Ⅱ抑制剂抗肿瘤活性，使肿瘤耐药性增高。④细胞凋亡相关

的癌基因介导的 MDR。乳腺癌细胞可以通过逃避凋亡或拮抗凋亡来获得生存，研究已发现了一些与细胞凋亡抑制有关的癌基因的表达产物可阻断或阻碍多种因素诱导的细胞凋亡，使细胞产生耐药性。虽然人们对乳腺癌多药耐药的分子机制远未形成系统性的理论，许多问题仍有待于阐明，如各种跨膜转运泵基因的作用机制，多种 MDR 机制间的相互关系等，但不断积累的认识已经为进一步寻找解决乳腺癌化疗耐药的方法奠定了基础。

解决乳腺癌化疗耐药难题，关键在于寻找有效的逆转耐药的方法。针对乳腺癌化疗耐药的分子机制，近年来人们尝试通过各种途径来降低耐药的发生。已有的方法包括针对单个耐药基因的传统逆转剂和反义寡核苷酸、反义 RNA 及核酶技术，但疗效均不满意。乳腺癌耐药是多个基因相互作用的基因网络调控的结果，因此，传统技术诱发的单一癌基因的阻断不可能完全逆转肿瘤的耐药现象。RNA 干扰技术（RNA interference，RNAi）的出现，为解决这一难题带来了曙光。RNAi 可以利用同一基因家族的多个基因具有一段同源性很高的保守序列这一特性，设计针对这一区段序列的双链 RNA（dsRNA）分子，只注射一种 dsRNA 即可以产生多个基因同时剔除的表现，也可以同时注射多种 dsRNA 而将多个序列不相关的基因同时剔除，因此在逆转乳腺癌耐药领域具有广泛的前景。

RNA 干扰是 1998 年由卡耐基研究院 Fire 等首次发现并命名的转录后水平的基因沉默机制。根据碱基互补配对的原则，当细胞内导入 dsRNA 或短发夹 RNA（shRNA）表达载体时，与之互补的内源性 mRNA 编码区裂解，从而导致基因表达沉默。RNA 作用主要分为三个阶段。一是起始阶段，类核糖核酸酶Ⅲ家族的 Dicer 降解 dsRNA 为 21～23nt 的小干扰 RNA（siRNA），这些片段的 3′端有两个碱基突出的双链结构，是 RNA 发挥干扰作用的效应分子。二是效应阶段，siRNA、Ago（argonaute）蛋白家族的成员和其他辅助因子一同结合成为 RNA 诱导的沉默复合物（RNA-induced silencing complex，RISC）。然后，RISC 经 ATP 供能解开 siRNA 双链，其中有义链被裂解，反义链与同源互补 mRNA 结合，并经历核酸酶的裂解，使其丧失蛋白质编码功能。三是 RNAi 信号放大阶段，在依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶和 Dicer 作用下，以靶 RNA 裂解产物作为效应分子，再次激活 RISC 以催化另一轮靶 RNA 的裂解。基于 RNAi 技术的序列特异性和抑制基因表达的高效性，人们开始在逆转乳腺癌耐药领域开展该技术的研究和应用。

将 RNAi 技术用于逆转乳腺癌化疗耐药的体外研究已取得可喜的成果。通过 RNAi 技术，封闭多个特定的耐药相关基因功能，从而增加乳腺癌的药物敏感性，有望为提高化疗效率带来新的突破。Wu 等使用化学合成的 siRNA 在具有 MDR 表型的 MCF7/AdrR 和 MCF7/BC19 乳腺癌细胞中干扰 MDR1 的表达后，MDR1 的 mRNA 和 P-gp 水平显著下降，细胞内紫杉醇和多柔比星积累较对照组显著增加。

siRNA 使 MCF7/AdrR 和 MCF7/BC19 细胞对长春花碱的耐药性降低至 1/232 和 1/49，使 MCF7/AdrR 细胞对多柔比星和紫杉醇的耐药性降低至 1/12 和 1/95。实验结果肯定了特异性 siRNA 能够有效抑制 MDR1 编码的 P-gp，提示 siRNA 为有效逆转多药耐药提供了新的途径。Munkácsy G 等以 RNAi 技术封闭对表柔比星耐药的 MCF7 乳腺癌细胞株中的 PSMB7 后，使化疗后残留的乳癌细胞从 79.8% ± 13.3% 下降到了 31.8% ±6.4% ，增加了表柔比星化疗的敏感性。Sun 等在体外实验中，利用 P-1/siRNA 抑制血管内皮生长因子 C（VEGF-C）mRNA 和蛋白质的表达，并增加了凋亡的比例（13.1% ～38.9% ），使乳腺癌的化疗敏感性得到提高。

然而，在彻底解决乳腺癌耐药难题之前，RNAi 作为一种处于探索中的疾病治疗手段，仍有许多问题有待阐明：①RNAi 技术的靶向性问题。如何寻找合适的载体，将 siRNA 准确安全地导入乳腺癌病灶组织仍是 RNAi 技术临床试验的最大障碍。病毒载体是一种有效的方法，可以提供临床应用所需要的极好的组织特异趋向性和转导有效性。但每种病毒载体都带有不同的危险因素和安全性问题，限制了其在临床上的应用。Wanga 等研究了一种多功能转运体 THCO，为有效的 siRNA 转运带来了希望。②RNAi 技术安全性问题。在 RNAi 技术有效抑制靶 mRNA 的同时，非靶向可能会对人体产生毒性。有研究发现，siRNA 或 shRNA 表达载体导入动物体内可能会激发 IFN 激活基因的产生，从而发生细胞毒性反应。研究人员必须探索如何优化干扰序列的问题，同时应选择最合适的干扰物用量以最大程度保证试验个体的安全。③RNAi 技术有效性和持续性问题。有些靶基因可能在复制过程中产生突变，以逃避机体的免疫监视和基因工程药物的抑制作用，同时会阻止 siRNA 对靶序列的识别。所以，要选择较保守的靶基因序列作为 siRNA 的识别序列。直接转染合成的 siRNA 在哺乳动物细胞内很容易被降解，这种方法很难实现稳定的 RNAi，使用包装颗粒包裹效应物可延长 siRNA 持续作用的时间。病毒载体能在哺乳动物细胞内稳定表达 siRNA，可达到长期抑制靶基因表达的目的。

解决乳腺癌化疗耐药难题，是一项巨大的工程，从基础研究走到临床研究，到进入临床应用，每一步都需要艰苦的努力。RNAi 技术的应用，是其中的重要突破口，希望随着 RNAi 技术的不断成熟和完善，有效逆转乳腺癌化疗耐药，以改善乳腺癌全身治疗效果，延长患者生存时间和提高生活质量。

参 考 文 献

Li WT , Zhou GY , Song XR ,et al . 2005 . Modulation of BCRP mediated atypical multidrug resistance phenotype by RNA interference .Neoplasma ,52(3):219～224

Liu F , Xie ZH , Cai GP ,et al . 2007 .The effect of survivin on multidrug resistance mediated by P-glycoprotein in MCF-7 and its adriamycin resistant cells .Biol Pharm Bull ,30(12):2279～2283

Lord CJ, Martin SA, Ashworth A.2009.RNA interference screening demystified. J Clin Pathol, 62(3):195~200

Lv H, He Z, Liu X, et al.2007.Reversal of BCRP-mediated multidrug resistance by stable expression of small interfering RNAs. J Cell Biochem, 102(1):75~81

Marta Izquierdo.2005. Short interfering RNAs as a tool for cancer gene therapy. Cancer Gene Therapy, 12:217~227

Munkácsy G, Abdul-Ghani R, Mihály Z, et al.2010. PSMB7 is associated with anthracycline resistance and is a prognostic biomarker in breast cancer.Br J Cancer, 102(2):361~368

Sun P, Gao J, Liu YL, et al.2008. RNA interference (RNAi)-mediated vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) reduction interferes with lymphangiogenesis and enhances epirubicin sensitivity of breast cancer cells.Mol Cell Biochem, 308(1~2):161~168

Sun YL, Zhou GY, Li KN, et al. 2006. Suppression of glucosylceramide synthase by RNA interference reverses multidrug resistance in human breast cncer cells.Neoplasma, 53(1):1~8

Yuan J, Lv H, Peng B, et al.2009. Role of BCRP as a biomarker for predicting resistance to 5-fluorouracil in breast cncer. Cancer Chemother Pharmacol, 63(6):1103~1110

Zhang X, Li J, Qiu Z, et al.2009. Co-suppression of MDR1(multidrug resistance 1)and GCS (glucosylceramide synthase) restores sensitivity to multidrug resistance breast cancer cells by RNA interference(RNAi).Cancer Biol Ther, 8(12):111711~111721

撰稿人:傅佩芬

浙江大学医学院附属第一医院

瘢痕的形成机制及治疗

The Formation Mechanism and Treatment of Scar

瘢痕（疤痕，scar，cicatrix）是各种创伤后引起的正常皮肤组织的外观形态和组织病理学改变的统称。它是人体创伤（即使是轻微的损伤）后，在伤口或创面自然愈合过程中的一种正常的、必然的生理反应，也是创伤愈合过程的必然结果。瘢痕的本质是一种不具备正常皮肤组织结构及生理功能的、失去正常组织活力的、异常的、不健全的组织。其具体的定义只能从皮肤改变的组织病理结构甚至超微结构上并结合临床具体表现加以描述。

瘢痕的分类目前尚无统一的标准。按瘢痕组织的病理学表现，瘢痕可分为正常皮肤瘢痕、增生性瘢痕和瘢痕疙瘩三类。正常皮肤瘢痕的组织切片表层为菲薄的上皮结构，仅由几层上皮细胞组成，无皮钉，称瘢痕表皮。深层为增厚的结缔组织，主要为胶原纤维，无弹力纤维以及真皮乳头、毛囊和腺体等皮肤附件结构。增生性瘢痕表面为数层上皮细胞，形成很薄且光滑的覆盖层，有时出现角化或细胞增生，无皮钉，但可有棘皮样改变向下伸展，其下真皮层为胶原纤维所替代，胶原纤维较厚，排列不太规则，但有与其长轴平行的倾向，这些弧形长索状胶原组成旋涡状组织学支架，其中有大量的细胞浸润。瘢痕疙瘩主要由大量致密的、较粗的、呈旋涡状不规则排列的胶原纤维束所构成。胶原束呈嗜酸性，着色淡，肥厚，透明，稍有折光性。与增生性瘢痕相比，后期瘢痕疙瘩的成纤维细胞较少。

当机体组织特别是皮肤组织受到一定深度的损伤后，创面先出现炎症反应，白细胞、巨噬细胞、肥大细胞等浸润，释放出多种细胞因子（生长因子），成纤维细胞和肌成纤维细胞大量增生并合成大量的胶原和基质，造成胶原代谢与排列的异常，异常基质的沉着，加上微循环和自由基因素的影响，促进了瘢痕的形成。有时炎症因子消退后肉芽组织可以被周围正常组织完全吸收，不经历瘢痕增生过程，但有时则继续增生。到目前为止，关于瘢痕增生的原因，提出了感染、坏死、血栓、水肿、免疫、异物刺激、遗传性等学说。

瘢痕尤其是增生性瘢痕和瘢痕疙瘩，不仅破坏了体表美，还可妨碍相关组织或器官的生理功能，甚至导致畸形和功能障碍，严重影响患者的身心健康。研究瘢痕组织的形成、发展和转化不仅仅对解决病人皮肤愈合的后遗症有重大意义，而且对人体一系列重要疾病过程（如肝硬化、肾萎缩等）也有重要意义。

成年人和动物伤口主要通过大量纤维组织增生来愈合并最终导致瘢痕形成，这与胎儿伤口的无瘢痕愈合不同。这两种不同修复方式的主要区别之一为 TGF-β（transforming growth factor-β，转化生长因子-β）表达水平的差异。TGF-β起着关键作用，它不仅可加速成纤维细胞的增殖和分裂，还可促进胶原的基因表达和蛋白质合成，增生性瘢痕组织被发现过度表达 TGF-β和其受体。TGF-β信号转导的基本过程是：TGF-β族配体→受体→Smads 蛋白→转录因子→DNA 表达。近年的研究表明，阻断 TGF-β的信号转导能有效抑制 TGF-β的生物学效应并抑制瘢痕形成。此外，表皮生长因子（EGF）抑制成纤维细胞收缩，TGF-β增强其收缩；Nath 等发现胚胎血管修复与内皮细胞生长因子（EDGE）及其受体有关，此类受体具有酪氨酸激酶活性，存在于胎鼠血管早期分化的内皮细胞表面。

胎儿皮肤组织创伤修复后无瘢痕形成，这种现象由 Burrington 在 1971 年首先发现，并提出"无瘢痕愈合"（fetal scarless wound healing）的概念。Krummel 等总结了无瘢痕愈合的主要特征：①创伤后无急性炎症反应；②真皮细胞外基质中透明质酸含量较高；③愈合后真皮胶原纤维呈正常网状排列。无瘢痕愈合为瘢痕的防治展示了美好的前景，因此近年来对其进行了广泛深入的研究，并取得一些进展。一般认为无瘢痕愈合与胎儿伤口独特的生理愈合环境、与成年组织不同的细胞外基质成分、成纤维细胞的内在特性有关，还受多种细胞因子的调控，细胞因子可能在无瘢痕愈合中调控成纤维细胞不同细胞类型的表达。

无瘢痕愈合组织重建是成年伤口愈合的最理想目标，胎儿无瘢痕愈合的研究，可以帮助人们寻找防治瘢痕的途径。但目前尚有很多问题无法解答，例如：何种因素直接影响胶原的正常排列？胎儿生理环境对无瘢痕愈合的直接关系是什么？细胞因子如何调控胎儿伤口愈合过程？相信随着研究的深入，这些问题将逐渐清晰起来，并为控制瘢痕增生打下理论基础。

目前治疗瘢痕的方法很多，但是任何方法距离无瘢痕愈合都相当遥远，任何单一的方法都不能达到理想的疗效，一般采用综合疗法，如手术切除、植皮、加压疗法、放疗、冷冻、激光、皮损内糖皮质激素注射等。中医药治疗瘢痕也具有一定的疗效，但现有治疗瘢痕的方药多为零散的单方、验方，尚未研制出有效的中成药或拆方研究确切的药物单体，用药途径单一，这些都有待于进一步研究。

瘢痕治疗困难的根源是：瘢痕形成机制，影响皮肤瘢痕发生、发展的因素尚未完全清楚，尤其是分子机制和基因水平的研究还不够深入。

近年来，现代细胞生物学和分子生物学研究的介入，推动了创伤愈合研究的深入发展。通过观察创伤愈合过程中的细胞活动及其影响因素，从细胞和分子水平探讨愈合过程的调控机制，丰富和深化了对创伤愈合的认识，形成了创伤愈合的现代概念。其中十分引人注目的一个发现就是，多种体液介质和细胞介质参与

了对炎性细胞和修复细胞的行为，包括细胞的迁移、增殖、分化，以及胶原的分泌、沉积和更新等的调控。创伤愈合的现代概念要求人们用新的观点去认识瘢痕形成的机制。正因为如此，有关细胞生长因子参与瘢痕形成调控的研究也已开始引起人们的重视，尽管这些研究工作还只是刚刚开始，但它启示我们产生这样一种思路：通过人为方式对生长因子调控胶原合成的机制施加影响，有可能实现控制胶原过度产生和瘢痕形成的愿望。

瘢痕的基因治疗是一项新兴的生物技术，但是该应用尚处于初始阶段。所谓基因治疗，就是向靶细胞引入外源基因，以纠正或补偿其基因缺陷，从而达到治疗目的。对瘢痕而言，由于人们对其形成的机制还未深入到基因水平，故应用基因治疗的方法治疗瘢痕还为时过早。但是，作为一种全新的、彻底的治疗手段，它在临床上的巨大潜力和希望是没有人否定的，随着科学技术的发展，人们对瘢痕形成的基因表达调控机制也会逐步深入，基因治疗将会真正造福于人类。

参考文献

郭建辉，曹毅．2007．瘢痕治疗的研究进展．浙江中医药大学学报，31(3)：402～404

宋儒耀，方彰令．2002．美容整形外科学．北京：北京出版社，282～343

王炜．1999．整形外科学．杭州：浙江科学技术出版社，426～445

Burrington JD. 1971. Wound healing in the fetal lamb. J Pediatr Surg, 6(5): 523～528

Krummel TM, Nelson JM, Diegelmann RF, et al. 1987. Fetal response to injury in the rabbit. J Pediatr Surg, 22(7): 640～644

Krummel TM, Sieber WK. 1987. Closure of congenital abdominal wall defects with umbilicoplasty. Surg Gynecol Obstet, 165(2): 168～169

Lindblad WJ. 2000. Gene therapy in wound healing—2000: a promising future. Wound Repair Regen, 8(6): 441～442

Liu W, Cao Y, Longaker MT. 2001. Gene therapy of scarring: a lesson learned from fetal scarless wound healing. Yonsei Med J, 42(6): 634～645

Massagué J, Wotton D. 2000. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. EMBO J, 19(8): 1745～1754

Shah M, Rorison P, Ferguson MWJ. 2000. The role of transforming growth factors bata in cutaneous scarring. In: Garg HG, Longaker MT eds. Scarless Wound Healing. New York: Marcel Dekker, 213～226

撰稿人：虞渝生　谈伟强

浙江大学医学院附属第一医院

激素难治性前列腺癌的治疗

The Therapy of Hormone Refractory Prostate Cancer

前列腺癌是老年男性泌尿生殖系统的常见肿瘤之一，在美国其发病率居男性恶性肿瘤之首，死亡率占男性死亡原因的第二位。在我国，前列腺癌的发病率相对较低，但随着我国经济的发展和人民生活水平的提高，前列腺癌在我国的发病率和死亡率逐年增高。

前列腺癌是一种雄激素依赖性恶性肿瘤。内分泌治疗是目前前列腺癌的主要治疗方法，大多数患者起初都对内分泌治疗有反应，但经过中位时间14～30个月后，几乎所有患者病变都将逐渐发展为激素非依赖性前列腺癌。在激素非依赖性前列腺癌发生的早期有些患者对二线内分泌治疗仍有反应，称为雄激素非依赖性前列腺癌（androgen-independent prostate cancer，AIPC），而对二线内分泌治疗无反应或二线内分泌治疗过程中病变继续发展的则称为激素难治性前列腺癌（hormone refractory prostate cancer，HRPC）。

HRPC定义应同时具备以下①～④4个条件：①血清睾酮达去势水平（<50ng/dl）；②间隔2周连续3次前列腺特异性抗原（prostate-specific antigen，PSA）升高；③抗雄激素撤退治疗4周以上；④二线内分泌治疗期间PSA进展；⑤骨或软组织转移病变有进展。其中⑤不必一定具备。

一般情况下，HRPC患者的生存期很少能超过12个月，因此如何针对这部分患者进行治疗就成为一个极具挑战性的课题。最大的难点在于HRPC的形成机制尚未阐明，主要的可能机制是：①雄激素抵抗前列腺癌细胞克隆的选择性生长；②前列腺癌细胞适应去雄环境；③前列腺癌细胞信号转导通路发生改变；④雄激素受体和受体旁路发生改变，包括雄激素受体扩增或突变，生长因子或细胞因子下调，共激活因子改变及凋亡基因的下调等。

对HRPC患者而言，理想的治疗方法应获得以下结果：患者的生存期延长，症状改善，生活质量提高，治疗方便且副作用小。但到目前为止，尚缺乏能够满足以上全部条件的治疗手段。对于预后较差的HRPC，目前主要的治疗方法是化疗，其中以多西紫杉醇为基础的化疗方案是HRPC治疗中的首选。美国FDA在2004年5月批准多西紫杉醇75mg/m^{2}联合泼尼松的3周方案为治疗HRPC的一线治疗，现在欧洲及亚洲许多国家也以这一方案作为HRPC的标准治疗方案。但是，多西紫杉醇联合泼尼松的治疗对患者生存期的影响不大，且其毒副作用大

尤其血液毒性，使得无症状或轻微症状的 HRPC 患者不适合此化疗方案。多西紫杉醇联合其他药物的化疗也在研究中，这些药物包括雌二醇氮芥、骨化三醇、沙利度胺、贝伐单抗及阿曲生坦等。在二线化疗方面，米托蒽醌、沙铂、长春瑞滨、埃博霉素和 ixabepilone 等药物的相关研究也在进行。

免疫治疗方面：前列腺癌一直被认为是一类适宜于免疫治疗的肿瘤。免疫治疗主要是提高抗前列腺癌的特异性 T 细胞的增殖，控制关键性的免疫刺激通路，保持和延长抗原提呈细胞和 T 细胞的活性，调节肿瘤的衰退。前列腺特异性抗原、前列腺酸性磷酸酶（prostatic acid phosphatase，PAP）和前列腺特异性膜抗原（prostate-specific membrane antigen，PSMA）的疫苗能诱导抗原特异性 T 细胞的激活，最终可以攻击肿瘤细胞。树突细胞、细胞因子也可以作为免疫治疗的靶向目标。Sipuleucel-T、DCVax-prostate 和 prostate GVAX 疫苗已进入Ⅲ期临床研究。由于疫苗接种的免疫反应需要一定的时间，免疫治疗可能更适合于肿瘤较小或病变进展缓慢的无症状的 HRPC 患者。

前列腺癌基因治疗是将目的基因转移至前列腺癌肿瘤细胞内进行表达，从而达到抑制肿瘤细胞生长的目的，包括修正基因治疗、自杀基因治疗和基因免疫调节治疗等。现在已经发现 HRPC 的发生、发展过程中，存在多种致癌基因和抑癌基因的异常表达，如 Bcl-2、丛生蛋白基因、热休克蛋白 27 等。针对这些异常的靶基因进行反义核苷酸修饰，从而达到抑癌、杀癌的作用，现在临床上已经有许多靶向基因治疗项目开展，其中 Bcl-2 反义核苷酸 G3139、丛生蛋白反义核苷酸 OGX-011、热休克蛋白 27 反义核苷酸 OGX-427 都得到了广泛的关注。

HRPC 患者大多数已经接受较长时间的雄激素去除或阻断治疗，是发生骨质疏松和骨折的高危人群。同时绝大多数发生骨转移的 HRPC 患者会合并骨痛症状，也容易发生病理性骨折。前列腺癌骨转移病灶多为成骨性，在肿瘤骨形成的同时也会导致溶骨细胞活性增加，因而可能促发骨痛症状。双膦酸盐（bisphosphonates）是人工合成的焦膦酸盐化合物，通过结合至骨代谢异常的部位，对抗破骨细胞的水解酶，抑制破骨细胞的活动和增殖，从而抑制骨质吸收。唑来膦酸是第三代双膦酸盐，具有持续缓解骨痛、降低骨相关事件的发生率、延缓骨并发症发生时间的作用，是目前治疗和预防 HRPC 骨转移的首选方法。

随着 HRPC 分子机制研究的不断深入，为治疗提供了很多潜在的策略：维生素 D 类似物、血管生成抑制剂、内皮素受体拮抗剂、反义寡核苷酸和小分子抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂等，这些都是 HRPC 治疗研究的新方向。未来 HRPC的治疗可能将依赖多种方法联合治疗。

参考文献

Calabro F, Sternberg CN. 2007. Current indications for chemotherapy in prostate cancer pa-

tients. Eur Urol,51(1):17～26

Hadaschik BA, Gleave ME. 2007. Therapeutic options for hormone-refractory prostate cancer in 2007. Urol Oncol,25(5):413～419

Heidenreich A, Von Knobloch R, Hofmann R. 2001. Current status of cytotoxic chemotherapy in hormone refractory prostate cancer. Eur Urol,39(2):121～130

Jose D, Donald J. 2004. Mechanisms of androgen-refractory prostate cancer. N Engl J Med, 351(15):1488～1490

Oh Wk, Kantoff PW. 1998. Management of hormone refractory prostate cancer: current standards and future prospects. J Urol,160(4):1220～1229

Saad F, Gleason DM, Murry R, et al. 2002. A randomized, placebo-controlled trial of zoledronic acid in patients with hormone-refractory metastatic prostate carcinoma. J Natl Cancer Inst, 94(19):1458～1468

Sonpavde G, Hutson TE. 2006. New approaches in hormone refractory prostate cancer. Am J Clin Oncol,29(2):196～201

Stavridi F, Karapanagiotou EM, Syrigos KN. 2010. Targeted therapeutic approaches for hormone-refractory prostate cancer. Cancer Treat Rev,36(2):122～130

Suzuki H, Ueda T, Ichikawa T, et al. 2003. Androgen receptor involvement in the progression of prostate cancer. Endocrine-Related Cancer,10(2):209～216

撰稿人:谢立平　刘　犇
浙江大学医学院附属第一医院

神经源性下尿路功能障碍的治疗

Management of Neurogenic Lower Urinary Tract Dysfunction

调节和控制排尿功能的中枢神经系统或周围神经受到损害而引起的膀胱功能障碍称为神经源性膀胱（neurogenic bladder），神经源性膀胱不但影响膀胱功能，而且也影响尿道的功能，故现又称神经源性下尿路功能障碍（neurogenic lower urinary tract dysfunction）。临床上表现为储尿和排尿功能的异常，如尿频、尿失禁、排尿困难、尿潴留等。神经源性下尿路功能障碍的原因有颅脑病变，如颅脑损伤、脑卒中、肿瘤、帕金森病、脑炎、先天性颅脑畸形等；脊髓病变，如脊髓外伤、脊髓灰质炎、脊髓肿瘤、脊柱裂、脊髓脊膜膨出、骶骨畸形、骶骨发育不良等；外周神经的病变，如糖尿病、盆腔手术等；另外，还有少数病人原因不明。

神经源性下尿路功能障碍如果没有得到合理、及时的治疗，常常会引发各种并发症，如反复尿路感染、尿路结石、皮肤湿疹、肾积水、肾功能衰竭而导致病人死亡。第二次世界大战以前，80% 以上的脊髓损伤患者由于并发症（主要是泌尿系统的并发症）在 3 年内死亡。第二次世界大战后，尽管创伤和康复医学得到快速发展，但截瘫病人的泌尿系并发症发生率仍相当高。1972 年，Donnelly 等随访了 370 例在第二次世界大战时由战伤所致的截瘫病人，结果发现 90% 的患者有肾盂肾炎。近年来，医学知识迅猛发展，医学新技术层出不穷，对神经源性下尿路功能障碍的认识和治疗也取得了较大进展。但迄今为止，神经源性下尿路功能障碍的治疗大多为对症处理，未从病因上进行治疗，所以患者仍无法获得“治愈”。神经源性下尿路功能障碍患者不仅生活质量低下，而且随时面临各种并发症导致死亡的可能。

由此可见，神经源性下尿路功能障碍的治疗是个由来已久的难题，研究和解决这个难题具有重大的科学意义：可深入探索神经系统对下尿路功能的作用及下尿路功能障碍对机体的各种影响；由于神经细胞的再生非常困难，神经细胞的损害往往是不可逆的，神经系统的损伤和疾病往往无法“根除”，若对神经源性下尿路功能障碍治疗取得突破性进展，则为解决各类难治性的神经系统疾病提供了坚实的科学基础。

目前神经源性下尿路功能障碍的治疗原则：保护上尿路功能，改善储尿和排尿功能，预防尿路感染等各种并发症，提高患者生活质量。

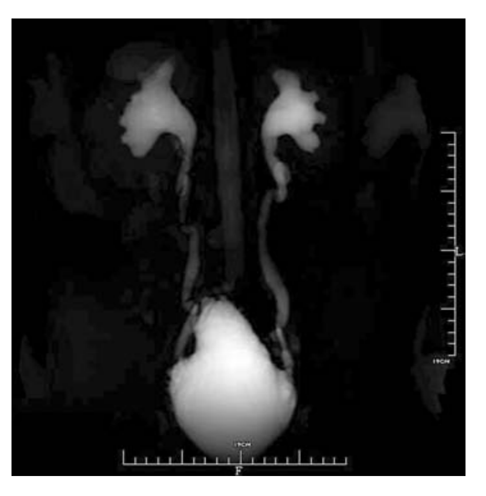


图 1　神经源性下尿路功能障碍患者磁共振尿路成像（MRU）

膀胱形态呈“圣诞树”样，双肾积水，双侧输尿管扩张

唐山大地震导致 16 万人伤残，约 4000 人截瘫。医学专家对地震后 25 年截瘫患者死亡原因分析发现，其中慢性肾功能不全导致的死亡占 49.37%，因此保护肾脏功能就是保护生命，是神经源性下尿路功能障碍治疗的首要目标。大量的临床研究发现，导致肾功能不全的主要因素是膀胱内高压而不是反流，只要膀胱内压力＞40cm H_2O，就有上尿路损害的可能，低顺应性膀胱往往容易形成膀胱高压导致上尿路功能的损害。根据不同病情，我们可选用不同方法改善膀胱的顺应性从而保护肾功能：最简单的方法为口服药物治疗，临床常选用 M 受体拮抗剂，如托特罗定、卫喜康等，但往往需要长期服用，且部分患者无法耐受药物的副作用；内镜下 A 型肉毒素逼尿肌注射由于疗效明显，操作简单，所以常用于口服药物治疗无效的患者，但缺点是需反复注射且费用昂贵；膀胱扩大术可确实有效地改善膀胱的顺应性，但手术风险较大，有较多并发症，且扩大后的膀胱往往无收缩力或收缩乏力，需间歇性导尿，不适用于有上肢功能障碍的病人。

神经源性下尿路功能障碍必定有逼尿肌和尿道括约肌的功能受损，所以患者伴有储尿和（或）排尿功能的异常，临床表现为尿失禁和（或）排尿困难。对于尿失禁的治疗首先需明确尿失禁的类型：逼尿肌反射亢进可引起急迫性尿失禁；逼尿肌收缩乏力导致慢性尿潴留，可发生充溢性尿失禁；尿道括约肌的受损可引起压力性尿失禁；有时上述两种或几种因素同时存在，可导致混合性的尿失禁。急迫性尿失禁的治疗可采用膀胱训练，选用 M 受体拮抗剂或内镜下 A 型肉毒素逼尿肌注射；充溢性尿失禁可采用定期排尿，间歇性清洁导尿，必要时可行经尿道外括约肌切开术。尿道括约肌功能障碍导致的尿失禁可采用尿道中段悬吊、人工尿道括约肌等。神经源性下尿路功能障碍患者排尿困难的原因主要为逼尿肌收缩乏力、逼尿肌括约肌收缩失协调。根据不同的病因可选择下列不同的治疗方法：使用增加逼尿肌收缩的药物、间歇性清洁导尿、经尿道外括约肌切开术等。新近报道，骶神经调节（sacral neuromodulation）可改善部分神经源性下尿路功能障碍的储尿和排尿功能，但由于价格昂贵，疗效有限，其应用价值有待进一步考证。尽管改善储尿和排尿功能的方法很多，但我们要根据不同病情，合理选

择。切忌选择的方法虽然能改善排尿和储尿功能，却导致肾功能的损害。因为生活质量的改善必须以生命的延续为前提。

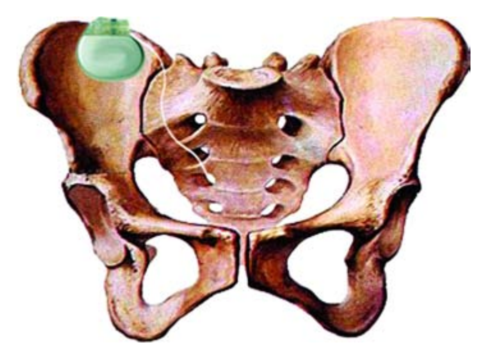


图2　骶神经调节系统示意
电极插入 S_3 骶管，刺激发生器植入臀部皮下

泌尿系感染是神经源性下尿路功能障碍的另一个常见并发症，在唐山大地震的截瘫病人中，泌尿系感染导致死亡的占26.58%。大量残余尿、膀胱输尿管反流、肾积水是尿路感染的主要原因；另外，长期留置导尿、膀胱造瘘和间歇性导尿成为尿路感染的诱发因素。保持膀胱低压、减少残余尿（<100ml）是预防泌尿系感染的关键。合理运用抗生素、防止抗生素耐药也是预防致死性尿路感染的重要因素。尽管我们采取了一系列措施，但尿路感染在神经源性下尿路功能障碍病人中的发病率依然很高，需要我们进一步研究。

到目前为止，几乎所有神经源性下尿路功能障碍的治疗为对症处理，而神经源性下尿路功能障碍的根源在于支配膀胱和尿道神经的损害导致相应肌肉的功能发生障碍。彻底“治愈”神经源性下尿路功能障碍的难点在于：神经细胞为永久性细胞，损害后再生困难，下尿路往往很难重新获得神经支配；去神经支配的下尿路往往发生肌肉萎缩和组织的纤维化，如何逆转膀胱和尿道组织去神经支配后的病理变化也是个医学难题。

我国有学者试图通过将体神经移植至盆神经，建立皮肤-中枢神经-膀胱反射弧，从根本上治疗神经源性下尿路功能障碍。尽管该设想为治疗提供了新的思路，但手术机制、适应证、疗效等仍令人置疑。此外，随着分子生物学技术的进步，神经干细胞移植和组织工程学为彻底“治愈”神经源性下尿路功能障碍提供了可能，但尚处于试验阶段。

参考文献

Roberts MM .2008 .Neurophysiology in neurourology . Muscle Nerve ,38(1):815～836

Roth CC, Kropp BP .2009 . Recent advances in urologic tissue engineering .Curr Urol Rep, 10(2):119～125

Rubenwolf PC , Beissert A , Gerharz EW ,et al . 2010 . 15 years of continent urinary diversion and enterocystoplasty in children and adolescents : the Würzburg experience .BJU Int ,105(5): 698～705

Steers WD .2003 .Editorial : use of neuronal stem cells to treat neurogenic bladder due to spinal cord injury .J Urol ,170(4Pt 1):1426

Stöhrer M ,Blok B , Castro-Diza D ,et al .2009 . EAU guidelines on neurogenic lower urinary tract dysfunction .Eur Urol ,56(1):81～88

Van Rey FS , Heesakkers JP .2008 .Applications of neurostimulation for urinary storage and voiding dysfunction in neurological patients .Urol Int ,81(4):373～378

Wyndaele JJ .2010 .Medical conditions and outcomes after spinal cord injury . Spinal Cord ,48(6):437

Xiao CG , de Groat WC , Godec CJ ,et al .1999 .“Skin-CNS-bladder” reflex pathway for micturition after spinal cord injury and its underlying mechanisms .J Urol ,162(3Pt 1):936～942

撰稿人:谢立平　金晓东

浙江大学医学院附属第一医院

恶性脑肿瘤无法根治吗

Could Malignant Brain Tumors Not Be Cured

恶性脑瘤（包括原发性和继发性）一直是威胁人类健康的严重疾病之一。在过去30年里，原发性恶性脑瘤的发生率呈逐年递增趋势（尤其是在老年人群中），年增长率约1.2%。同时，由于诊断技术的发展，越来越多的继发性脑瘤被发现，因此如何防治恶性脑瘤已成为21世纪医学的重大难题。

人脑宛如一个非常精细的机器，负责指挥人的行为、运动、思想、意识、情绪等。恶性脑瘤，如胶质瘤、淋巴瘤、转移瘤、生殖细胞瘤等，可发生于人脑内任何一个或多个部位，干扰或破坏脑相关的功能，引起语言障碍、肢体瘫痪、视觉障碍、内分泌紊乱、癫痫、昏迷等，对患者、家庭及社会造成了巨大负担。脑瘤发生率国外报道为（5～10）/10万人，国内无确切的数据，据临床统计可达32/10万人。脑瘤中胶质瘤占45%。近年来，随着新的诊疗技术的广泛应用，恶性脑瘤病人的生命和生活质量有所延长和提高。但是，总的预后还是非常差，例如，多形胶质母细胞瘤（WHO分类Ⅳ级）经手术、放疗、替莫唑胺（TMZ）化疗等综合治疗后，生存率2年为27.2%，5年仅为9.8%。为什么这么多治疗手段和相关费用的投入，恶性脑瘤还是无法根治呢？

探索和解决这个难题首先要从恶性脑瘤的生物学特性说起。由于恶性脑瘤呈浸润性生长，目前尚未找到恶性脑瘤特异性的血清学标志物，难以早期诊断。大多数患者都是在肿瘤长得相当大或出现临床症状后，通过CT或磁共振检查（MRI）才被发现。治疗方面，虽然目前可通过多种先进的设备和技术，如神经导航、术中高和超高场强MRI、机器人系统等提高肿瘤切除率，但受肿瘤浸润性生长和脑功能区的限制，手术无法达到生物学上的全切。残留的肿瘤，可通过神经纤维传导束逃逸，使肿瘤复发。虽然近来有磁共振波谱（MRS），可提高肿瘤细胞的识别能力，但它还是难以发现浸润在正常细胞和组织内的肿瘤细胞。因此，迄今的影像学手段还无法完全确定恶性脑瘤的边界。由于恶性脑瘤无法全切除，约80%的复发肿瘤局限在原发灶周围2cm以内，因此术后常辅以放、化疗。

可是，目前的放、化疗仍无法杀灭肿瘤细胞，究其原因，乃因肿瘤细胞具有强大的抵抗力，例如，DNA损伤检验点反应（DNA damage checkpoint response）在辐射耐受中起着重要的作用，研究发现脑瘤干细胞（BTSC）通过激活DNA损伤检验点反应（放疗后高表达活化的ATM、Rad17、Chk1及

Chk2）及其高效的DNA修复能力使其有超强的放疗耐受性。同样，对化疗抵抗的相关研究也使得MGMT（O^6-甲基鸟嘌呤-NAD甲基转移酶）基因启动子甲基化状态浮出“水面”。但可以肯定的是，这仅仅是恶性脑瘤放化疗抵抗的“冰山之一角”，还有更多的方面需要去研究。恶性脑瘤的生物治疗包括主动和被动免疫治疗，是今后治疗的发展方向之一。虽然目前已经发现恶性脑瘤免疫逃逸的一些新规律，但更多的机制如肿瘤的脑内转移机制等还有待阐明。一般来说，恶性脑瘤复发后其生物学行为会发生改变，大约50%恶性程度会加大，表现为复发病灶比原发灶生长速度更快，更具有侵袭性，对各种治疗的反应性明显降低。这些期待我们去发现恶性脑瘤复发机制，以求有效地控制肿瘤。由于恶性脑瘤涉及的基因数量非常多，仅涉及一两个基因的治疗无疑不会有很好的疗效。

解决上述难题需要使用新的高通量、高科技手段，全面、系统地对比初发和复发恶性脑瘤的生物学特点，从中筛选出关键的复发因素或治疗靶点，为将来新的治疗手段的建立提供平台。更为重要的是，大规模地通过临床试验、用循证医学手段来评估现有的、新的治疗方法和药物对恶性脑瘤的疗效。

需要多学科合作，采用更先进的方法早期诊断恶性脑肿瘤的发生，通过寻找新的特异性生物学标志来随访患者和评估治疗效果；需要更详尽和全面地揭示大脑的功能和结构，通过更精细的手术影像系统来提高手术切除程度，同时最大程度地保护神经功能，以保证患者的术后生存质量；需要从分子生物学层面探索恶性脑瘤的发生发展机制，以便从源头上进行防治。

参考文献

Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, et al. 2005. MGMT gene silencing and benefit from Temozolomide in glioblastomas. N Engl J Med, 352: 997～1003

Roger Stupp, Monika E Hegi, Warren P Mason, et al. 2009. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase Ⅲ study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. Lancet Oncol, 10: 459～466

Yao Y, Tao R, Wang X, et al. 2009. B7-H1 is correlated with the malignancy grade of gliomas but it is not the privilege of tumor stem-like cells. Neuro Oncol, 11: 757～766

撰稿人：周良辅　姚　瑜
复旦大学附属华山医院

长期昏迷患者能恢复意识吗

Can Long-Term Coma Patients Recover

意识被马克思比喻为地球上最美丽的花朵，是人类最难解答的科学难题之一。有关意识本质的争论至少有130多年的历史，具有代表性的有唯精神论、诺贝尔奖获得者Francis Crick的还原论，以及以笛卡儿、冯特和著名的神经科学家John Eccles为代表的二元论等。

人类意识研究的任何进展对于脑科学来说都是极为重要的。意识机制的深入理解对于加深人类自身的了解，其重要性极为广泛深远。临床上，全球每年新增的中枢神经系统创伤患者至少在一千万以上，颅脑损伤导致巨额医疗费用支出、巨大的劳动力损失和社会负担；尤其是长期昏迷等严重意识障碍患者，包括植物状态（vegetative state，VS）和微意识状态（minimally conscious state，MCS）患者的治疗，是极大的社会负担和复杂的法律、伦理、社会问题。有关植物状态患者治疗价值的争论在2005年美国总统布什签注法案的Terri Schiavo事件中达到顶点。深入了解意识的机制，如何判断长期昏迷等严重意识障碍患者是否存在意识、是否可能恢复意识具有非常重要的现实意义。

昏迷是由于大脑皮质及皮质下中枢内的网状结构系统发生高度抑制，造成严重的意识障碍，出现意识持续中断或意识完全丧失，是高级神经活动广泛抑制的表现，导致觉醒状态、意识内容和躯体主动运动的完全丧失。脑死亡是最严重程度的深昏迷，是以脑干为主的脑功能完全不可逆的停止。Jennett最早提出的植物状态概念是指对自我和环境完全无知的临床状态，伴有觉醒-睡眠周期，可完全或部分保留下丘脑和脑干的自主功能，以维持呼吸和循环功能。所以通常认为植物状态患者是没有意识的状态。微意识状态的概念是近年来意识研究最重要的进展之一。微意识状态是指具有微小但非常明确的行为证据表明能感知自我和环境的一种严重意识改变的状态，是一种处于植物状态和意识清醒之间的过渡状态，被认为可能是深入了解意识机制的最好切入点之一。但微意识状态患者仍然缺乏和周围环境相互交流的能力。

由于在动物实验中进行意识观察评价具有很大的局限性，人类临床实验受伦理限制，意识的研究目前仍然是神经科学最为复杂、最为困难的领域之一，究竟意识是一种状态还是一种功能？意识与哪些脑区的功能相关，其神经网络又是如何构成的？探求研究意识可靠、科学、高效的手段，探索意识的机制，探寻判断

严重意识障碍患者预后的早期评价指标，以及寻找有效的意识障碍康复治疗方法等是当今神经科学研究值得关注的热点。

随着科学技术的进步，关于意识的研究已经从单纯的哲学研究逐步进入了自然科学研究范畴。近年来，有不少利用听觉诱发电位、双频谱指数（bispectrial index，BIS）和事件相关电位 P300 进行意识相关方面的研究；神经递质的研究，尤其是胆碱系统的研究也是意识相关研究的重点之一。但是，近 10 余年最深远的研究进展还是功能神经影像学：单电子发射计算机体层摄影（SPECT）、正电子发射扫描（PET），尤其是功能性磁共振成像（fMRI），为脑功能的研究提供了新的手段和思路。

血氧水平依赖（BOLD）的脑功能磁共振成像技术通过利用磁化率敏感的快速高分辨率梯度回波或 EPI 技术检测脑活动引起的局部磁化率改变，可以实时、无创地反映适宜刺激下中枢皮质相应区域的功能状态，以较高的时空分辨率使功能性神经解剖学研究得以长足发展；其三维定位技术可用于研究神经网络水平的信息处理。2006 年，Owen 首次利用语言刺激功能磁共振扫描发现植物状态患者可以存在与正常志愿者相似的听觉皮质网络激活，提示存在较为完整的听觉皮质神经网络和听觉意识，这是对植物状态突破性的认识。最近，Monti 等进一步证实植物状态患者可以存在临床未能觉察的意识活动。

如何能够早期判断昏迷、植物状态和微意识状态患者是否有可能进一步恢复意识呢？静息态功能磁共振为意识研究提供了新的思路。最近静息态功能磁共振默认网络（default network）研究发现，在植物状态可以保存有皮质与皮质间的功能连接，但比正常对照组显著减弱，并且缺乏丘脑与皮质间的功能连接；在楔前回和网状上行激动系统之间的连接严重损害，且与意识损害的严重程度相关；而脑死亡的患者不存在上述脑区之间的功能连接。目前已发现静息态活动的脑区包括前额叶中内侧部、扣带回前部、扣带回后部及顶下小叶等区域。这些脑区参与大脑内外环境的监测、情节记忆及自我意识活动。究竟这些脑区的活动是否是构成意识的基础？它们相互之间的解剖和脑功能连接是如何联系的？它们和其他哪些脑区一起形成意识神经网络呢？它们相互之间的联系和调控机制又如何？是否可能探寻包括静息态脑区在内的意识神经网络，将其功能连接状态作为严重意识障碍患者预后早期评价的指标呢？这些问题仍需大量的前瞻性研究来回答，从而进一步深入了解意识的机制。

意识的康复目前尚无特效方法，常规治疗是为了预防并发症和排除恢复过程中的一些障碍；药物疗法上，有关支链氨基酸、多巴胺激动剂、氢氯金刚烷胺、唑吡坦等的疗效有争议，仍需进一步的研究；深部电刺激（DBS）、高压氧治疗、传统中医疗法、顺势疗法和刺激疗法，疗效同样不确定并存在争议。探寻意识功能康复行之有效的治疗手段是神经科学任重而道远的艰巨使命。

参考文献

Boly M, Tshibanda L, Vanhaudenhuyse A, et al. 2010. Functional connectivity in the default network during resting state is preserved in a vegetative but not in a brain dead patient. Human Brain Mapping, 30: 2393～2400

Giacino JT, Ashwal S, Childs N, et al. 2002. The minimally conscious state: definition and diagnostic criteria. Neurology, 58: 349～353

Jennett B, Plum F. 1972. Persistent vegetative state after brain damage: a syndrome in search of a name. Lancet, 1: 734～737

Monti MM, Vanhaudenhuyse A, Coleman MR, et al. 2010. Willful modulation of brain activity in disorders of consciousness. The New England Journal of Medicine, 362(7): 579～589

Owen AM, Coleman MR, Boly M, et al. 2006. Detecting awarenss in the vegetative state. Science, 313: 1402

Silva S, Alacoque X, Fourcade O, et al. 2010. Wakefulness and loss of awareness Brain and brainstem interaction in the vegetative state. Neurology, 74: 313～320

Vanhaudenhuyse A, Noirhomme Q, Tshibanda LJF, et al. 2010. Default network connectivity reflects the level of consciousness in non-communicative brain-damaged patients. Brain, 133: 161～171

撰稿人：周良辅　吴雪海　胡　锦

复旦大学附属华山医院

骨质疏松和骨质疏松性骨折：古老而现实的难题

Osteoporosis and Osteoporotic Fracture：
An Ancient But Realistic Puzzle

骨质疏松症是个古老的话题。曾几何时，有人以为骨质疏松随着年龄的增长而出现，就像一个人年龄大了会长白头发一样不可避免，没有什么可研究的。其实不然，骨质疏松症是人类最普遍的骨骼疾病，它与疼痛相伴，引起残废，还陡然增加死亡的危险，已经成为人类健康的主要威胁。

骨质疏松症主要累及绝经后妇女和老年男性，随着社会老龄化，其发病率升高趋势明显。根据《2007 年国民经济和社会发展统计公报》披露，2007 年年末我国人口总数为 132 129 万；60 岁以上的占 11.6%；到 2020 年老年人口将达到 2.48 亿，占 17.17%，社会老龄化的速度引人关注！在我国，60 岁以上的老年人群中约 80% 患有不同程度的骨质疏松；据预测，到 2010 年我国骨质疏松患者约为 11 400 万，2025 年约 15 100 万，到 2050 年将超过 2 亿，骨质疏松症的防治迫在眉睫！

骨质疏松症是全身性骨骼疾病，以骨量低、骨组织的微结构破坏为特点，其结果是骨骼的脆性增加，容易发生骨折。在骨质疏松症患者中，骨折的发病率为 20% 左右，且呈逐年上升的趋势。一旦发生骨质疏松性骨折，患者将饱受身心痛苦，因为随之而来的并发症会大大降低他们的生活质量。骨质疏松性骨折好发部位依次为椎体、髋部、前臂等。椎体骨折虽然最多见，但给家庭和社会带来巨大危害的还是髋部骨折。髋部骨折的患者中，12%～20% 可能死亡，50% 终身需要他人护理，没有人可以恢复到骨折前的功能水平！不言而喻，骨质疏松性骨折不仅给患者带来无尽的痛苦，不菲的医疗费用也将成为患者、家庭和社会的沉重负担。骨质疏松性骨折作为一个现实的问题摆在我们面前，预防和治疗骨质疏松性骨折责无旁贷！

我国社会老龄化的进程已经产生巨大数量的骨质疏松性患者，随之出现相应数目的骨质疏松性骨折病例，使临床治疗的负担日渐沉重，促使人们回归预防为主的卫生策略：防治骨质疏松性骨折最有效的措施是及早诊断和治疗骨质疏松症，预防骨质疏松性骨折的发生。

有效治疗骨质疏松症的关键之一是阐明其发生机制，进行对因治疗。骨质疏松是由遗传和环境因素共同作用的复杂疾病，对其遗传背景的研究经过了 15 年

的努力，只是阐明遗传因素影响峰值期（20～40 岁）骨密度高低，以及绝经后和老年时期骨量丢失的速度，仍然没有筛选到影响中国人群的风险基因型。因此，需要开展候选基因单核苷酸多态性（SNP）筛查，分析各基因型和单倍型与峰值骨密度变异、骨质疏松及其骨折风险的关系，争取获得骨质疏松或骨折的风险基因型，并据此对高危人群及早进行干预，减少发生骨质疏松性骨折的风险。

在我国，骨质疏松诊断仍应用 WHO 推荐的双能 X 线吸收仪检测腰椎和髋部骨密度。不过，$-2.5s$ 是否是中国人群骨质疏松性骨折预测的最合适阈值，学术界仍在争论，需要开展前瞻性研究加以确定和澄清，从而制定出更科学更适合我国人群的、统一的诊断标准。我们还亟须建立大样本量的正常人群骨转换指标参考值，将血液骨转换指标的测定用于骨质疏松症的诊断和疗效评估；建立我国正常人群和骨质疏松患者 25-(OH) D_3 水平的数据库，有效实施补充维生素 D 预防骨质疏松症的重要举措。

目前，骨质疏松症的治疗主要依赖于药物。已知并在应用的药物包括抑制破骨细胞活性、促进成骨细胞生成、促进骨化等三大类；正在研究的有抗破骨细胞分化因子抗体、内皮整合素受体阻滞剂、胰岛素样生长因子和破骨细胞质子泵抑制剂等；另外，选择性组织蛋白酶 K 抑制剂可能成为治疗原发性骨质疏松症的新药。不过，目前还没有一种能真正逆转骨质疏松的药物，其研究和开发任重道远。

骨质疏松性骨折的治疗困难重重、危机四伏，是困扰骨科临床的另一个难题。第一，骨质疏松者骨结构破坏，对内植物的把持力下降，使本来能够有效治疗骨质正常的骨折的内植物用于处理骨质疏松性骨折时却难以奏效。尽管临床上开始应用一些新的内植入物，例如锁定钢板，通过提供坚强的角稳定性来固定骨质疏松的骨折块，但发生内植物失效的概率依然很高。临床上亟须研制新的内植入物，改善骨折内固定的有效性。第二，骨质疏松者骨转换的周期改变，成骨细胞的活性降低，骨折愈合的速度和质量都不及正常的骨折；愈合时间长使后期内固定的稳定性降低，可能造成内固定失效。临床上需要用新的手段和措施，设法促进骨质疏松性骨折的愈合，缩短愈合时间，尽早开始有效的康复锻炼，以恢复和改善骨折肢体的功能。第三，骨质疏松性骨折多呈粉碎而且有压缩，复位后出现骨骼缺损的情况不在少数。结果是要么内固定在术中难以达到即时稳定性，要么内植物在术后面临松动失效甚至断裂的尴尬。亟须寻找既能填充骨缺损提高内固定的即时稳定性，又不阻碍骨折愈合的进程的骨替代物。第四，骨质疏松性骨折由于固定稳定性的缺陷加上老年人行动不便，难免需要卧床、制动，其结果是骨量快速丢失，骨折后骨密度在 3～6 个月内持续下降。需要在治疗骨折的同时，适当应用骨吸收抑制剂，抑制骨量快速丢失，治疗骨质疏松症，预防和降低再骨折风险。不过，围手术期应用骨吸收抑制剂是否会影响骨折愈合一直存在争议。

因此，开发一种既能促进骨形成骨愈合又能抑制骨吸收的新药物已成为当务之急。

参 考 文 献

刘建平.1998.骨质疏松的流行病学和防治研究近况.实用预防医学,5:602～611

聂四平.2008.我国骨质疏松症诊断标准的制定原则及方法探讨.中国骨质疏松症杂志,14:270～284

中国健康促进基金会骨质疏松防治中国白皮书编委会.2009.骨质疏松症中国白皮书.中华健康管理学杂志,3(3):15～26

David S, Oliver A, Geockeritz B, et al. 2010. All about osteoporosis: a comprehensive analysis. J Musculoske Med, 27: 149～153

Deng HW, Stegman MR, Davies M, et al. 1999. Genetic determination of variation and covariation of peak bone mass at the hip and spine. J Clin Densitom, 2: 251～263

Leblank A, Schncider V, Evans H, et al. 1990. Bone mineral loss and recovery after 17 weeks of bed rest. J Bone Miner Res, 5: 843～850

Li NH, Ou PZ, Zhu HM at al. 2002. Prevalence rate of osteoporosis in the mid aged and elderly in selected parts of China. Chin Med J, 115(5): 773～775

Lill CA, Hesseln J, Schlegel U, et al. 2003. Biomechanical evaluation of healing in a non-critical defect in a large animal model of osteoporosis. J Orthop Res, 21: 836～842

Mauck KF, Clarke BL. 2006. Diagnosis, screening, prevention, and treatment of osteoporosis. Mayo Clin Proc, 81(5): 662～672

Wu XP, Liao EY, Zhang H, et al. 2004. Determination of age-specific bone mineral density and comparison of diagnosis and prevalence of primary osteoporosis in Chinese women based on both Chinese and World Health Organization criteria. J Bone Miner Metab, 22: 382～391

撰稿人：曾炳芳　李晓林
上海交通大学附属第六人民医院

脊髓损伤治疗是否应遵循进化论原则

Does Treatment of Spinal Cord Injury Follow the Evolutionary Theory

为什么低等脊椎动物的脊髓在损伤后可以做到完全的再生，而高等脊椎动物却不能？为什么各种综合干预策略应用于大鼠脊髓损伤可以获得运动在内的较满意的功能恢复，而人却不能？为什么脊髓损伤修复中进化较低的神经结构其修复能力优于进化较高的神经结构？上述问题在现有脊髓损伤基础与临床研究中真实存在，而又不能完全解释。脊髓损伤治疗是否应遵循进化论的原则？回答了这个问题，可能会引起脊髓损伤修复治疗的一次变革。

干细胞治疗帕金森病的初步成功使一些学者认为利用干细胞移植可以治疗神经系统的其他疾病，脊髓损伤也在其中。这种想法看似顺理成章，但恰恰是忽略了这样一个根本而且重要的事实：帕金森病的病理基础是原始的成神经节细胞，而脊髓损伤所涉及的是高级的高度发育的运动神经元如贝茨细胞。神经系统的进化通过了以下历程：没有神经（原生动物）→原始的神经系统（海绵动物）→网状神经系统（腔肠动物）→梯形神经系统（扁形动物）→链状神经系统（环节动物及节肢动物——神经节细胞）→管状神经系统（脊椎动物——贝茨细胞)。成熟的神经细胞与成神经节细胞在进化谱系中相隔数百万年，完全不可同日而语。早在 20 世纪 70 年代，著名的生物学家特奥多修斯·多布然斯基就一针见血地指出：如果不以进化理论为根据，生物学的一切将毫无意义。低等脊椎动物，比如说鱼类和两栖类动物，以及处在胚胎发育中的高等脊椎动物能够完成躯体组织结构的完全再生，这种再生包括中枢神经系统的脊髓。然而，随着物种进化和发育，这种再生能力逐渐减弱甚至消失，其细胞及分子机制并不清楚。由此，我们应该认真研究低等脊椎动物与高等脊椎动物脊髓再生修复能力差异的机制，探讨低等脊椎动物与哺乳类动物大鼠及猴脊髓损伤后修复过程中细胞及分子机制的差异，探讨其间在脊髓结构进化上的差异，为人类脊髓神经再生寻找理论依据、指导原则和治疗靶点。

1. 应研究不同进化级别物种其脊髓再生及修复能力差异的机制

在高度进化的哺乳动物，脊髓损伤曾一直被认为“无法再生和修复”。随着科学的发展，包括细胞移植在内的综合治疗策略应用在大鼠脊髓损伤模型，获得运动在内的较满意的功能恢复。将嗅鞘细胞（OEG）移植于脊髓损伤大鼠皮质脊髓束后可获得包括运动在内的较满意的功能恢复，而接受 OEG 移植的患者也将 OEG 移植于皮质脊髓束，以期获得损伤节段以远运动功能的恢复，但结果恰恰相反，患

者仅可获得轻度至中等程度的功能改善，功能恢复程度和可能性由高到低为：①皮肤营养状况；②痉挛；③膀胱和肠道功能；④浅感觉；⑤运动（仅限于损伤区域）。这与进化论是完全吻合的，进化较低的结构其修复能力较强，这些低级功能首先得到了恢复。相同的移植策略，在临床和实验上得到了不同的结果，是否也反映了同属哺乳动物的人（灵长类人科）与大鼠（啮齿类鼠科）神经系统进化上的差异呢？我们应该研究分析这种差异，并使其能为我们所利用，从而使得相同的治疗策略使用在人体脊髓损伤后能够达到类似大鼠恢复的结果，将基础研究结果真正地过渡到临床。

2. 应研究不同进化级别的神经结构其再生及修复能力差异的机制

现代人中枢神经系统是宇宙中已知最复杂、发展最高的物体系统，考古和种族进化知识为人们提供了现代人中枢神经系统各部分的发生过程。现代人中枢神经系统中，最古老的结构是嗅系统、边缘系统、网状结构。这一判断的根据是，这些系统存在于原始和早期动物化石中，其他系统则存在于较晚发生的动物和它们的化石中。道理上，不同神经结构修复的可能性也应遵循进化的顺序，也就是说，古老结构修复的可能性大，越晚发生的修复可能性越小。由古至今各系统的发展顺序是：网状结构、小脑系统、感觉系统和前脑系统，最后一项包括躯体运动（图 1）。脊髓中有连接大脑和周围神经系统的所有结构，因此，它涵盖了神经系统从最低级原始结构（网状结构）到最高级发达的神经元（贝茨细胞）以及其传导束（锥体束）的广阔范围。目前的基础研究结果显示，脊髓内修复能力的先后顺序是网状结构、小脑脊髓束、红核脊髓束、脊髓丘脑束、皮质脊髓束，且在脊髓损伤后网状结构也以发芽等方式参与到脊髓损伤区域的修复，这些结果与进化论完全相符，进化论对神经损伤后的修复规律的发现和总结有重要的指导意义。但同一个体内不同进化级别的脊髓神经结构可塑性及再生能力的差别，以及不同进化级别的神经结构在脊髓损伤的修复中扮演何种角色，目前仍不是非常清楚。

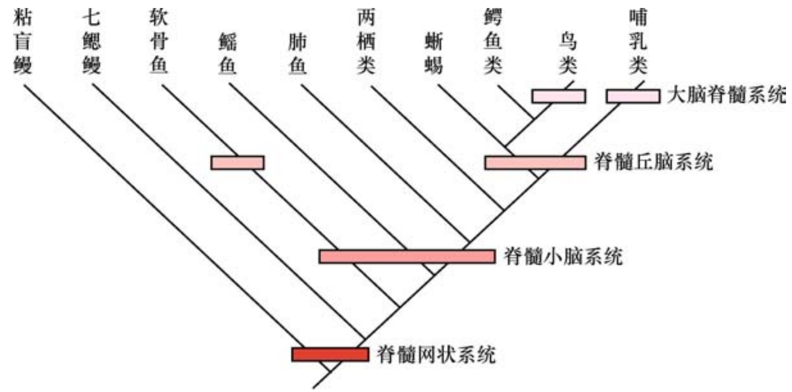


图 1　动物进化过程中神经系统各部分形成的次序（自下而上）
引自 Northcutt，1984

在脊髓损伤后神经结构修复再生及功能修复等相关的科学与技术上，我国科研已有相当的研究基础，但缺乏创新，研究思路不开阔。所以，我们应从最基础的生物学现象，比如说鱼类的脊髓完全再生、不同物种脊髓再生能力存在较大的差别着手，发掘其内部的自然规律，以促进人类脊髓能够模拟低等脊椎动物脊髓完全修复为目标，研究不同物种（鱼及两栖类、大鼠、猴等）脊髓及脊髓内不同进化级别的神经传导束；运用发育学、比较生物学、病理形态学、细胞生物学及分子生物学等方法，借助基因组学及蛋白质组学等新技术，从基因、分子、细胞、器官和整体的综合层次找到不同物种之间神经修复能力差异的原因和机制，尤其是低等脊椎动物与高等脊椎动物脊髓损伤后修复再生能力差异的原因和机制；揭示大鼠与猴在脊髓结构进化上的差异及脊髓修复再生能力差异的原因和机制，为基础研究的结果向临床转化提供进化方面的理论依据；找到同一个体内不同进化级别的神经结构修复能力差异的机制。根据找到的基因、分子、细胞、器官差异，进行脊髓损伤后的治疗干预研究，找到脊髓损伤新的治疗靶点和方向，从而为人类脊髓完全再生寻找新的突破点。

参考文献

孙天胜.2007.以进化论的观点评价细胞移植治疗脊髓损伤.中国脊柱脊髓杂志,17(9):651～653

Dobzhansky T.1973. Nothing in biology makes sense except in the light of evolution. American Biology, Teacher,125～129

Ferretti P, Zhang F, O'Neill P.2003.Changes in spinal cord regenerative ability through phylogenesis and development: lessons to be learnt. Dev Dyn, 226(2):245～256

Franssen EH, de Bree FM, Verhaagen J. 2007.Olfactory ensheathing glia: their contribution to primary olfactory nervous system regeneration and their regenerative potential following transplantation into the injured spinal cord.Brain Res Rev,56(1):236～258

Patestas MA, Gartner LP. 2006.A Textbook of Neuroanatomy. Oxford:Blackwell Science Ltd. 454

Ramon-Cueto A, Cordero MI, Santos-Benito FF,et al. 2000.Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. Neuron, 25:425～435

Salemi M, Vandamme AM.2003.The Phyogenetic Handbook—A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny.London: Cambridge University Press

Weidner N, Ner A, Salimi N,et al. 2001.Spontaneous corticospinal axonal plasticity and functional recovery after adult central nervous system injury. Proc Natl Acad Sci USA,98(6):3513～3518

撰稿人:胥少汀　孙天胜
北京军区总医院

健康老龄化视角下退行性关节炎的防治策略

Preventional and Therapeutic Strategy of Degenerative Arthritis in View of Healthy Aging

退行性关节炎是主要累及脊柱及四肢关节、发病率随年龄增长而显著增加且严重影响人群健康生活的骨科常见病，是所有骨科医生无法回避的难题。退行性关节炎所带来的挑战，在社会层面表现为影响人群广、显著影响生活质量、治疗周期长、患者和社会负担重。据统计，到2015年，我国将有2亿老年人，而60岁以上人群的患病率超过50%，75岁以上人群则高达80%。该病具有病程长、致残率高等特点，需要长期干预，甚至手术治疗，与之相关的医疗费用相当可观。随着社会人口的老龄化，患病人数正逐年迅速增加。早期预防、诊断和综合治疗退行性关节炎，成为促进健康老龄化所要面临的重大社会公共卫生问题。2000年1月，世界卫生组织正式启动全球“骨与关节十年”活动，以唤起各国政府、医学工作者、媒体及广大民众对这一疾病的重视，最大限度地减少这类疾病引起的伤残和对社会经济造成的损失。我国骨科界于2002年正式加入国际“骨与关节十年”，并把2002～2012年确定为中国的“骨与关节十年”。

从微观层面看，退行性关节炎虽然多见，但在发病机制、早期诊断、非手术及手术干预措施的研究方面都存在诸多难点和空白。根据2007年中国《骨关节炎诊治指南》的定义，退行性关节炎是因多种因素引起关节软骨纤维化、皲裂、溃疡、脱失而导致的关节疾病，与年龄和累积性损伤密切相关，也称其为骨关节炎。该病可累及软骨、软骨下骨、滑膜和关节内其他结构，但其特征性病理改变是软骨退变。已知年龄、体重、性别、肥胖、炎症、创伤、活动量、遗传等众多因素与其发病有关，但确切发病机制目前仍无定论，推测软骨营养因素、微循环障碍、细胞因子、软骨代谢平衡紊乱等具有重要影响。

关于退行性关节炎的分子机制知之甚少。Kawaguchi H 等应用大鼠遗传学方法发现，在内源性软骨钙化过程中产生的蛋白酶会导致关节中心部位的软骨退变和周围部分的骨赘形成。这种差异可能来源于血管分布的不同。在关节周边，血运来源于滑膜或肌腱，据此完成内生软骨钙化和骨赘形成，如胚胎期和生长板软骨。在中心部位，由于难以获得血运，因而导致软骨退变而不是被骨所替代。与内生软骨钙化相关的分子学研究成为骨关节炎机制研究的热点。

退行性关节炎的早期诊断依赖于对危险因素和发病机制的了解，但因相关危险因素的复杂性，使得现有的诊断方法有限并缺乏敏感性，所以早期诊断始终是困扰临床的难题。传统的 X 线检查对早期病变的敏感性很差，MRI 具有对软组织分辨率高、可多平面成像、无创及可重复性高等优点，是目前退行性关节炎早期诊断的主要方法，但检查费用较高。从分子生物学角度出发，探究蛋白质水平的诊断手段是目前的研究方向和热点。现已发现退行性关节炎病变局部分泌的一些细胞因子对关节软骨和滑膜有明显的破坏作用，其中以 IL-1 和 TNF-α 最为重要。两者可以刺激软骨细胞产生大量能够分解软骨基质的金属蛋白酶，打破金属蛋白酶与其抑制物之间的动态平衡，导致关节软骨进行性破坏和滑膜炎形成。高敏 C 反应蛋白与退行性关节炎患者的关节肿胀和疼痛程度呈正相关，对早期退行性关节炎也具有潜在的诊断价值。这些发现促进了退行性关节炎相关标记物的研究，此类标志物能够反映关节的新陈代谢，在影像学改变出现前就能对其早期诊断。由于退行性关节炎累及不同的组织，且生物过程复杂，因而目前认为最有希望的诊断方法是包括蛋白质组技术在内的复合生物标记物研究，即同时对多个标记物进行分析，从而提高生物标记物的诊断能力。蛋白质组技术有助于退行性关节炎特异性生物标记物的发现和治疗方法的发展。但其步骤繁杂、花费不菲，且灵敏度和准确率仍有待提高，因此还无法常规应用于临床，尚有大量问题需要解决。

在退行性关节炎的干预方面，现有方法主要是缓解症状和改善功能，无法做到长期有效地缓解疼痛，且大都伴有潜在的全身性副作用。关节假体置换是治疗严重退行性关节炎的有效方法，但存在创伤大、并发症多且花费大等问题，目前虽在假体的材料选择、几何设计、固定方式及手术技术等方面都有不断改进，但仍不能成为退行性关节炎的治疗首选。因此，退行性关节炎的有效治疗仍是临床骨科医生面临的巨大挑战。通过药物防治关节软骨退变，通过干细胞培养、组织工程学和基因治疗等方法促进损伤的关节软骨的自身修复，是研究本病的热点和难点。

现有的软骨修复方法包括微骨折、“马赛克”成形术和自体软骨细胞移植等，研究发现其最终结果通常是软骨的纤维修复（纤维软骨），这些纤维软骨缺乏透明软骨在承受分布于膝关节的压应力时所必需的生物力学特性。因此，随着时间的推移，纤维软骨会退变而导致最初症状的复发和退行性关节炎的进展。成功的软骨修复目标包括长期缓解疼痛、改善症状和维持功能、阻止早期关节炎进展、避免关节置换手术、重建透明软骨而不是纤维软骨。因此，第四代软骨再生修复集中于基因治疗、干细胞应用（骨髓、脂肪或肌肉来源）和组织工程技术。近年来，软骨修复的组织工程方法成为很有前景的新疗法。将自体软骨细胞和生物材料联合在体外扩增，成为组织再生的有效工具。这种治疗方法中细胞支架的应用

提供了一个组织形成前的三维结构，可以防止细胞从缺损部位流失。细胞支架具有足够的机械强度，易化细胞的单一扩增并刺激移植细胞的表达。Hyaff-11 是一种以透明质酸为基础的可生物降解聚合物，已被证明能够为组织工程修复提供有效的细胞载体。曾有报道种植在 Hyaff-11 上的人类软骨细胞能够在体外维持分化细胞的特点，表达和产生Ⅱ型胶原及蛋白聚糖聚合物等软骨表型的主要标志物，并下调Ⅰ型胶原（图 1）。而且，无论在动物模型还是人类的临床试验中，Hyaff-11 似乎都是软骨修复的有效细胞支架，有利于透明样组织的形成。期待新一代的自体软骨细胞移植联合基因治疗能够成为退行性关节炎治疗的有效手段。

总而言之，退行性关节炎这一长期影响人类健康的疾病，仍将是未来一段时间内的研究热点。其难点在于加深对其发病机制的透彻认识，并通过不断涌现的新技术、新材料和新药物开始早期、微创、简单、有效的治疗，同时兼顾从宏观层面普及该病的健康知识，调动广大群众防病治病的能动性，选择能够切实减轻而不是增加患者的医疗负担的有效治疗方法，这样才能更接近健康老龄化的目标。

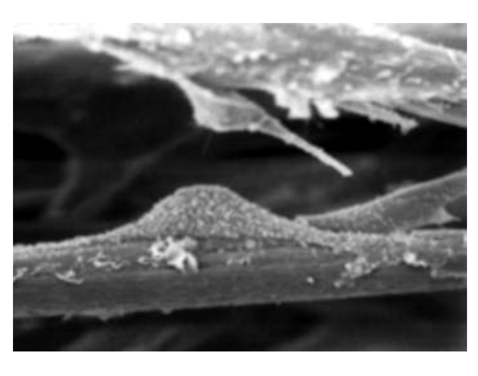


图 1 软骨细胞种植在 Hyaff-11 后 24 小时的电镜照片（×2000）

参 考 文 献

尚桂莲，徐焱成. 2007. 高敏 C 反应蛋白在骨关节炎早期诊断意义的探讨. 数理医药学杂志，20(4)：574～774

中华医学会骨科学分会. 2007. 骨关节炎诊治指南(2007 年版). 中华骨科杂志，10(27)：793～796

Cheung P P，Gossec L，Dougados M. 2010. What are the best markers for disease progression in osteoarthritis (OA)? Best Pract Res Clin Rheumatol，24(1)：81～92

Date H，Yamada H，Kanaji A，et al. 2007. Absolute risk for fracture and WHO guideline. Biological markers for osteoarthritis (OA). Clinical Calcium，17(7)：1071～1079

Falah M，Nierenberg G，Soudry M，et al. 2010. Treatment of articular cartilage lesions of the knee. Int Orthop，18

Grigolo B，Roseti L，Fiorini M，et al. 2002. Tissue engineering applications：cartilage lesions repair by the use of autologous chondrocytes. Reumatismo，54(4)：364～371

Kawaguchi H. 2009. Progress of research in osteoarthritis：molecular targeting for osteoarthritis treatment. Clin Calcium，19(11)：1608～1614

Kessler M W，Ackerman G，Dines JS，et al. 2008. Emerging technologies and fourth generation

issues in cartilage repair . Sports Med Arthrosc ,16(4):246～254

Ruiz-Romeroa C ,Blanco FJ . 2010 .Proteomics role in the search for improved diagnosis ,prognosis and treatment of osteoarthritis . Osteoarthritis and Cartilage ,18(4):500～509

撰稿人:邱贵兴　高　鹏

北京协和医院

全身麻醉的奥秘

The Mystery of General Anesthesia

现在已经很难想象如果没有麻醉，人类将会遭受多少难以忍受的痛苦？如果没有麻醉学，现代医学中的许多有创检查、介入治疗和手术又怎样完成？临床医学又将是一种什么样的情形？据史料记载，1800多年前华佗就用“麻沸散”来实施全身麻醉。自1846年现代全身麻醉术在美国问世以来，全球已有逾50亿人次成功地接受了麻醉，麻醉也被评为过去的2000年中人类最重要的发现之一。但是，全身麻醉药的作用部位何在？麻醉药又是通过什么机制几乎在瞬间发挥作用的？这些至今都仍是未解之谜。为了探寻这些谜团，人们曾进行过无数的实验并提出过很多的假说。随着认识的深入，有的假说被不断发展和修正，有些则因得不到证实而被摒弃。近年来，随着细胞和分子生物学技术的发展，受体蛋白的分离、纯化、分子克隆及膜片钳技术等在本研究领域的应用，大大增加了人们对全身麻醉的了解。

1. 全身麻醉的作用部位

搞清全身麻醉的作用部位，需要在宏观解剖结构、细胞和亚细胞显微结构及分子结构等多个水平做出定位。对宏观结构而言，中枢神经系统，包括脑和脊髓无疑是全身麻醉的作用部位。遗忘（amnesia）、催眠（hypnosis）和制动（immobility）是全身麻醉的必要组成部分。一般认为，麻醉药作用于脑产生遗忘和催眠作用，作用于脊髓产生制动作用。在细胞和亚细胞水平，全身麻醉作用可能发生在神经轴膜或突触。现普遍认为，全身麻醉是麻醉药抑制了兴奋性神经元和兴奋了抑制性神经元作用的共同结果。即使如此，全身麻醉药在分子水平的确切作用部位到底是细胞膜上的脂质区域还是膜蛋白依然是争论的焦点（图1）。

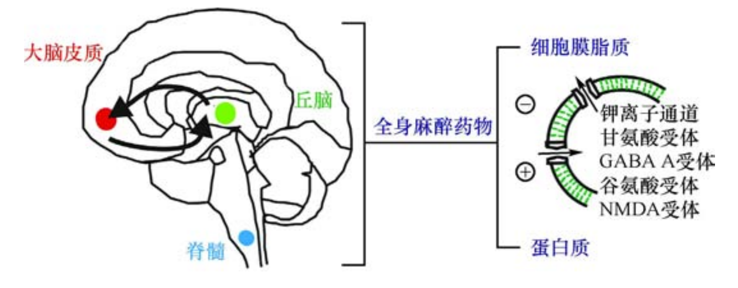


图1　全身麻醉药物可能的作用部位

（1）全身麻醉的脂质学说：20 世纪初，Meyer 和 Overton 发现尽管吸入全身麻醉药的分子组成和结构以及脂溶性有极大的差异，但它们在橄榄油中的溶解度与其麻醉强度呈正相关。通俗地说，在吸入能大量溶于橄榄油的吸入麻醉药时其肺中的浓度很低就能产生麻醉作用，而吸入不太溶于橄榄油的麻醉药时肺中的浓度要很高才能产生麻醉作用。用科学的数学公式来表示，即吸入麻醉药的油/气分配系数（$\lambda_{O/G}$）与其麻醉效价之乘积为一常数。据此推测，不管吸入麻醉药的分子组成和结构如何，只要其溶于中枢神经系统的某个（些）脂质性位点的分子数达到一恒定数量，全身麻醉就会立即产生。这就是现在被多数人接受的全身麻醉机制的脂质学说，也被称之为 Meyer-Overton 法则。一般认为，这个（些）脂质性位点就是神经细胞膜上的脂质区域。一定数量的麻醉药溶于神经细胞膜上的脂质区域后立即导致膜上离子通道发生改变而产生麻醉作用。尽管有些研究发现许多化合物的麻醉特性并不完全遵循 Meyer-Overton 法则，但至今也提不出比脂质学说更有说服力的理论。

（2）蛋白质作用学说：另一方面，研究发现全身麻醉药与蛋白质相互作用的现象十分普遍，尤其与细胞膜上的受体通道蛋白的相互作用可直接影响神经信号的传递，导致麻醉作用的产生。而且，全身麻醉药同分异构体的麻醉作用的质或量有明显的差异；采取分子生物学方法改变受体通道蛋白多肽链上的氨基酸组成，可使全身麻醉药的作用受到明显影响等，均提示全身麻醉药是直接与膜上的功能性蛋白作用而产生麻醉的。虽然蛋白质学说得到越来越多分子生物学研究结果的支持，但是目前还没有能发现一个遵循 Meyer-Overton 法则的统一的麻醉药物蛋白质作用靶位，而且应用转基因技术敲除一些被认为很重要的蛋白质并没有非常明显地改变麻醉药物的麻醉作用。

2. 全身麻醉作用机制

现已知的能产生全身麻醉作用的药物在分子结构、组成和化学特性方面都有很大差异，因而很难想象这些全身麻醉药物可以通过直接作用于同一个（类）受体而产生麻醉作用。但从物理特性上分析，即这些麻醉药的脂溶性与其麻醉作用强度具有惊人的相关特性，又强烈提示它们具有共同或单一的作用机制。

2005 年，Christian 等在前人研究基础上提出“多靶点-多作用机制”学说：麻醉药作用于大脑产生镇静催眠作用，作用于脊髓产生制动作用，产生催眠作用所需的血药浓度低于产生制动作用所需的血药浓度。目前认为一些全身麻醉药主要是作用于脑的 β_2-GABA A 受体（γ-氨基丁酸 A 型受体 β_2 亚基）产生镇静作用；主要是作用于脑的 β_3-GABA A（γ-氨基丁酸 A 型受体 β_3 亚基）产生催眠作用；主要通过作用于脊髓的多分子靶点，包括有 GABA A 受体、glycine 受体（甘氨酸受体）、glutamate 受体（谷氨酸受体，包括 NMDA 受体等）和 TREK-1 钾通道等产生制动作用（图 2）。

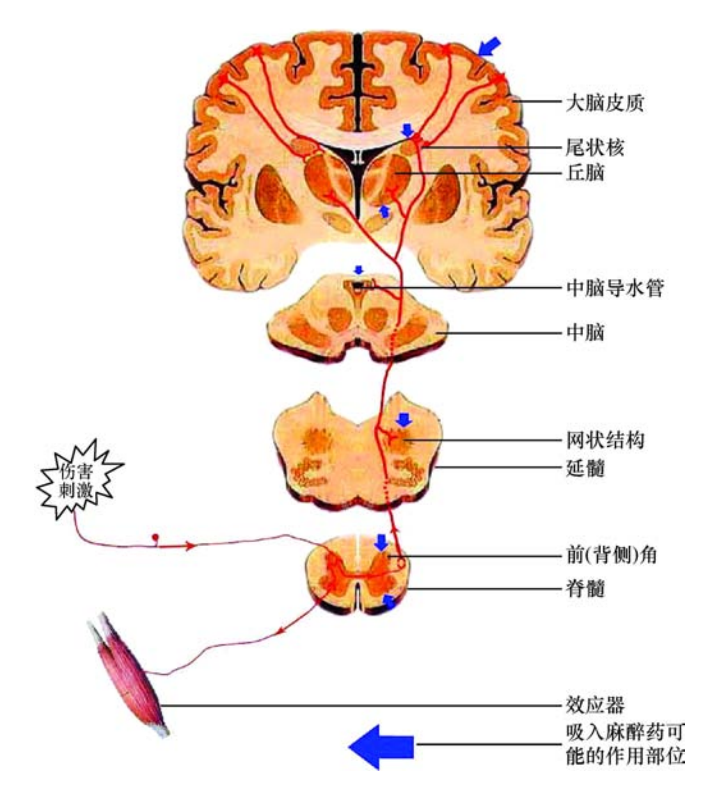


图 2　麻醉药作用于大脑产生镇静催眠作用，作用于脊髓产生制动作用，产生催眠作用所需的血药浓度低于产生制动作用所需的血药浓度

3. 全身麻醉机制研究的难点和研究进展

目前在分子水平上的研究发现全身麻醉药对很多离子通道和受体蛋白都有作用，但是这些分子水平的作用是如何改变整个神经系统以至于整体动物的功能，又如何解释全身麻醉药在整体动物和人体上的作用表现是个难题。比如，麻醉给药后如何迅速诱导进入睡眠状态，停药后又很快苏醒，而且这些改变如何能在短至数秒钟内完成，等等。

针对这些问题，目前的研究方向主要是使用基因工程的方法以及筛选、培育对麻醉药不同敏感性的动物品系（如果蝇）来阐述全身麻醉在分子水平与全身水平作用的联系。现代科学方法为此提供了有趣的研究切入点，如敲除动物(knock-out type)：用基因工程的方法使动物缺乏一种常见的离子通道；敲入动物（knock-in type)：用分子生物学的手段改变单个氨基酸，从而改变一种常见的离子通道，但并不改变这种离子通道在中枢神经系统的分布。通过将这些敲除和（或）敲入动物与野生型动物比较，与人类培育出的对麻醉药具有不同敏感性的动物品系比较，通过观察动物在整体水平上对麻醉药不同的反应，再通过研究

它们在分子机制上的区别，同时通过敲除或敲入特定部位的特定基因，可以研究麻醉药物的作用部位。通过这些技术和方法就可能了解到麻醉药在分子水平的作用是如何改变在体中的组织、器官及整个机体的。

全身麻醉药作用部位和机制的揭秘不仅将提高全身麻醉的安全性和可控性，以及促进新型麻醉药和催眠镇静药的研发，还将有助于揭示学习、记忆和睡眠等奥秘。因此，这是神经科学领域中一个亟待解答并具有重大科学意义和实用价值的基本科学问题，也是考验人类智慧的难题。显然，要解答这个十分有趣的科学难题需要更多青年学者在这个研究领域的全身心投入。

参 考 文 献

刘红，任笑蒙，陈兰英等.2004.果蝇吸入麻醉药麻醉作用相关基因的克隆.中国医学科学院学报，26:385～391

Campagna JA, Miller KW, Forman SA.2003. Mechanisms of actions of inhaled anesthetics. N Engl J Med, 348:2110～2124

Franks NP, Lieb WR.1984. Do general anaesthetics act by competitive binding to specific receptors? Nature, 310:599～601

Grasshoff C, Rudolph U, Antkowiak B.2005. Molecular and systemic mechanisms of general anaesthesia: the multi-site and multiple mechanisms concept. Curr Opin Anaesthesiol, 18: 386～391

Meyer H.1899. Theorie der alkoholnarkose arch. Exp Pathol Pharmakol, 42: 109～118

Rudolph U, Antkowiak B.2004. Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics. Nat Rev Neurosci, 5:709～720

Urban BW.2002. Current assessment of targets and theories of anaesthesia. Br J Anaesth, 89: 167～183

撰稿人：刘　进　陈向东
四川大学华西医院

疼痛机制之谜

The Central Mechanisms of Pain

疼痛是一种普遍存在的现象，由能使机体组织受损伤或破坏的刺激作用所引起，是一种对周围环境的保护性适应方式。这种致痛刺激在疼痛感受器接收之后，经过不同水平的痛觉传导通路，最后达到脑。对于疼痛机制的探索，是解释和治疗疼痛的必由之路。人们对疼痛进行了大量的实验研究和临床观察，但疼痛的机制仍然是一个有待解决的谜。关于疼痛机制的学说，一些与事实相差甚远，遭到否定，另一些在新的证据面前不断修正。多年来，对痛觉机制的认识主要有三种学说。

1. 特异学说

特异学说是对疼痛机制的经典解释。1664 年，Descartes 首次提出了特异学说，在医学教育中特异学说可以说是根深蒂固的。特异学说认为机体内存在特异的痛感受器、痛纤维和痛觉中枢，组成特异的痛觉系统，把来自皮肤的痛信号传递到脑的痛结构。经历几个世纪的研究，至今尚无充分的证据证实特异痛觉系统的存在。

2. 型式学说

型式学说又称模式学说，它认为机体内无特异的痛感受器、痛纤维和痛觉中枢。1894 年，Goldscheider 提出“刺激强度与中枢总和是疼痛的关键决定因素”。此学说演变为：①外周型式学说，认为疼痛是由外周过度刺激造成，这种刺激产生的神经冲动模式在中枢解释为疼痛。②中枢综合学说，认为疼痛的基本机制在中枢神经系统，并有总和作用。该学说主要解释幻肢痛、灼痛和神经痛。③感觉相互作用学说，认为存在一种特异性传入控制系统，正常情况下能防止总和现象发生，这个系统的破坏导致病理性疼痛。

3. 闸门控制学说

1956 年，Melzack 和 Wall 提出闸门控制学说，指出在脊髓背角内存在一种类似闸门的神经机制，它能够减弱或增强从外周向中枢的神经冲动。后几经修正，简述如下：①Aδ 纤维和 C 纤维传导的信号能激活脊髓背角上行的脑传递细胞（T 细胞），同时与脊髓背角的胶质细胞（SG 细胞，有兴奋型和抑制型两种）形成突触联系，粗纤维和细纤维的兴奋传导分别兴奋和抑制 SG 细胞，以突触的方式（亦可能有突触后抑制）调控 T 细胞，形成闸门开放和关闭效应。②脊髓

闸门机制受脑下行神经冲动的影响，特别是脑干下行抑制系统的影响。③只有脊髓背角 T 细胞的总体发放水平达到或超过某个临界值时，负责痛感觉和痛反应的作用系统才被触发（图 1A）。闸门学说是疼痛研究的一大进展。但是由于研究主要局限于实验，以致许多学者提出异议，而且激发了更加深入的研究。于是在 1983 年 Melzack 和 Wall 在他们的专著里结合新的事实和观点，对自己的原闸门学说做了修改和补充，可概括为三点（图 1B）：

（1）强调 SG 细胞的多功能性，既有抑制性又有兴奋性。把原来的 SG 细胞分为两种，即抑制性 SG 细胞和兴奋性 SG 细胞。

（2）原学说只包含了单纯的突触前抑制，现在强调这种抑制可能是突触前或突触后的，也可能两者都有。

（3）重视了脑干的下行抑制系统，并强调这种抑制是向脊髓闸门独立输入的。

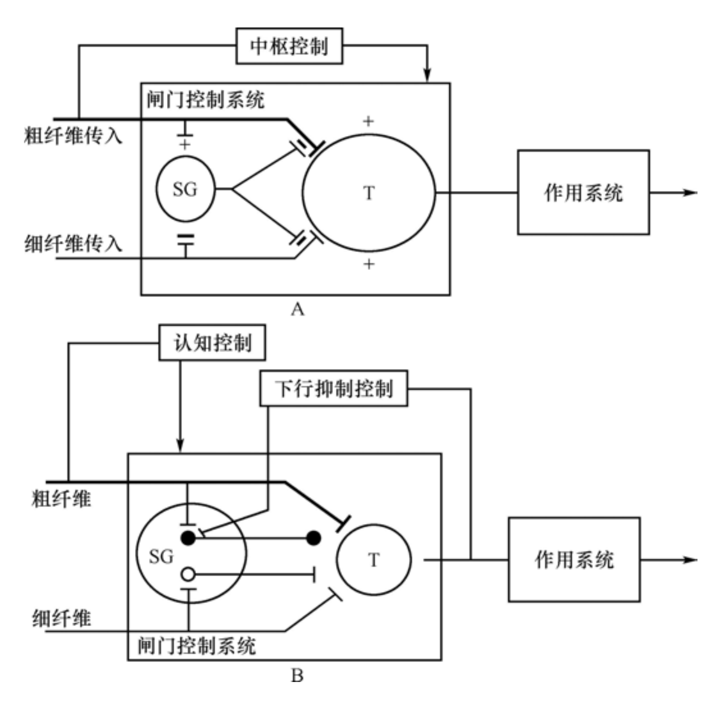


图 1 闸门控制学说模式

A. 最初的示意图；B. 修改后的示意图；＋. 兴奋；－. 突触前抑制；SG. 胶状质，其中实心圆表示抑制性细胞，空心圆表示兴奋性细胞；T. 传递细胞。引自 Melzack R，Wall PD. 1983. The Challenge of Pain

闸门学说的这种修改只能说对疼痛机制做了进一步的解释，并非最后的“真理”，对病理性痛觉过敏、触诱发痛和自发痛仍然没有做出解释。特别是近年来

所发现的与疼痛机制有关的多种生化物质，更为闸门学说和疼痛机制增添了更为复杂的内容。

解释痛觉的学说各不相同。但是，目前至少普遍认同的是，痛觉的感受器为广泛分布在皮肤各层、小血管和毛细血管旁结缔组织、腹膜脏层和壁层、黏膜下层等处的游离神经末梢，任何外界的或体内的伤害性刺激（物理的或化学的）均可导致局部组织破坏，释放 K^+ 、H^+ 、组胺、缓激肽、5-HT、ACh 和 P 物质等内源性致痛因子。

传导痛觉冲动的纤维属于最细的 Aδ 和 C 纤维，并认为 Aδ 纤维传导刺痛，而 C 纤维则传导灼痛。但必须指出，并非所有的 Aδ 纤维和 C 纤维仅传导伤害性刺激，它们也传导触、压、温、冷等感觉信息。而痛觉也并非仅由细纤维（Aδ 或 C 纤维）传导，也可由达到一定的空间和时间构型的粗纤维（Aα 纤维）传导。

总之，疼痛是由体内外伤害性刺激引起的一种复杂的心理生理过程。痛觉作为一种主观体验，伤害性冲动必然上升到大脑皮质，并在那里进入意识领域，但是，由于对知觉研究技术上的限制，很难在人体进行更深入的实验性研究。因此，在过去的二十年内，医学界对疼痛机制的认识虽然有了长足的进展，但由于疼痛形成和维持的参与因素非常复杂，目前仍然存在许多未知领域。今后的研究重点应从低级中枢转移到高级中枢上来，尤其是高级中枢对疼痛感知的研究。新近由于胶质细胞参与疼痛信号处理研究的兴起，为疼痛机制的研究翻开了崭新的一页，更为痛觉传递机制增加了神秘的色彩。

参 考 文 献

赵志奇. 2000. 疼痛及其脊髓机制. 上海：上海科技教育出版社，1～10

Besson JM. 1999. The neurobiology of pain. Lancet, 353(9164): 1610～1615

Block BM, Hurley RW, Raja SN. 2004. Mechanism-based therapies for pain. Drug News Perspect, 17(3): 172～186

Melzack R. 1993. Pain: past, present and future. Can J Exp Psychol, 47(4): 615～629

Niederberger E, Kühlein H, Geisslinger G. 2008. Update on the pathobiology of neuropathic pain. Expert Rev Proteomics, 5(6): 799～818

撰稿人：祝胜美　姚永兴

浙江大学医学院附属第一医院

全身麻醉对脑功能的影响

The Effect of General Anesthesia on Brain Function

全身麻醉是使患者产生意识消失、无痛等作用并且可逆的过程。随着麻醉结束，患者清醒，麻醉的影响是否就完全消失了呢？最近的研究认为，麻醉手术后会对患者的神经功能产生短期甚至长期的影响。对1218例行非心脏大手术的老年患者进行研究发现，在麻醉手术后1周内有25.8%、3个月内有9.9%的患者出现大脑功能紊乱，前者称之为早期认知功能障碍，手术创伤和麻醉药物的使用是造成麻醉手术后早期认知功能改变的主要原因，而后者谓之长期的认知功能障碍，主要与年龄有关。手术后认知功能障碍（postoperative cognitive dysfunction，POCD）不但影响患者康复，还增加术后一年内的死亡率。也有研究认为，全身麻醉和区域阻滞后认知功能障碍的发生率并无区别，因此麻醉对此的影响尚有争论。但多数研究认为全身麻醉处理会对脑的蛋白质表达和功能产生一定的影响，相关的影响会整合到人格行为、学习、记忆、认知功能当中。

1. 全身麻醉与中枢神经系统内物质变化

Futterer等研究了地氟烷吸入全身麻醉后大鼠脑中蛋白质表达的变化。应用二维凝胶电泳和质谱技术，分析大鼠在接受地氟烷麻醉3小时即刻以及24、72小时后神经元细胞胞质中蛋白质表达改变。结果显示在吸入麻醉后至少72小时内存在蛋白质表达改变，这些蛋白质在神经递质的突触传递及新陈代谢等方面发挥重要作用。这个时间远远长于临床上吸入麻醉后的恢复时间，这提示吸入性麻醉药可能对中枢神经元蛋白质的表达有长时间的影响。

2. 全身麻醉对学习、记忆和认知功能的影响

在人类的认知功能中，记忆是最核心和最重要的脑功能，记忆可分为外显记忆（explicit memory）和内隐记忆（implicit memory）。临床麻醉深度下患者的外显记忆消除，因此在合适的全身麻醉深度下，患者在术中并无知晓，但可能内隐记忆并未完全消除，对手术中不良事件的内隐记忆可导致患者出现焦虑、睡眠障碍等心理和行为的损害。

手术麻醉对认知功能的影响主要是发育期个体（产妇手术对胎儿的影响或者婴幼儿手术）或者老年个体。

在动物实验中，人们发现达到临床手术要求的麻醉药物浓度将对脑的学习、记忆、认知功能及行为表现产生一定影响。如Jevtovic-Todorovic等对出生7天

的大鼠麻醉 6 小时，其深度相当于达到临床外科手术要求，并使用常规儿科手术全身麻醉药物如咪达唑仑、氧化亚氮和异氟烷联合，结果发现，大鼠产生广泛的神经退行性变，并导致海马神经元突触传递功能损害，进而产生持久的学习、记忆功能缺失。

全身麻醉药导致脑神经细胞损伤可能与全身麻醉药的作用机制有关。全身麻醉药的确切作用机制虽未阐明，但目前认为主要与兴奋 γ-氨基丁酸（gamma-aminobutyric acid，GABA）受体或者抑制 *N*-甲基-*D*-门冬氨酸（*N*-methyl-*D*-aspartate，NMDA）受体有关。GABA 是成年中枢神经系统中主要的抑制性递质，但在出生后早期可能是兴奋性的递质，这一兴奋性作用主要通过 GABA A 受体实现。GABA A 受体广泛分布于胎脑及新生儿脑中，与成年中枢神经系统激活 GABA A 受体后氯离子内流致神经细胞超极化不同，发育期的大脑尤其是突触形成期，细胞内氯离子浓度很高，激活 GABA A 受体引起神经细胞去极化，导致细胞内钙离子浓度升高而损伤细胞。另一方面，应用 NMDA 受体拮抗剂可致 NMDA 受体表达上调，过度表达的 NMDA 受体导致细胞内钠离子及钙离子增加，可致细胞凋亡甚至坏死。因此，在儿科和产科麻醉中诱导和维持满足外科手术要求的麻醉深度可能会对发育期的人脑产生有临床意义的损害。但目前大样本的临床研究尚未发现麻醉后儿童学习、记忆受损的情况，良好的麻醉管理、避免缺氧等严重的并发症仍是麻醉科医生要关注的重点。

而老年病人由于脑老化，储备功能减少，在手术麻醉后容易发生认知功能障碍。临床表现为精神错乱、性格改变、学习记忆能力下降等。术后精神障碍常常是多种因素共同作用的结果，包括应激反应、创伤、术中出血和输血、脑血流降低、脑血管微栓子形成、血压波动、术后低氧血症及电解质紊乱等。但有研究认为吸入麻醉药异氟烷可导致脑内 β 淀粉蛋白沉积，而 β 淀粉蛋白沉积是阿尔茨海默病的病理特征。因此，全身麻醉可能是老年人术后认知功能障碍的重要原因。

随着研究的深入，必将阐明麻醉对脑功能影响包括术后认知功能障碍等的机制，而改善麻醉方法如应用新型麻醉药氙气（xenon），适当应用脑保护药物如利多卡因、右美托咪啶等有望改善全身麻醉对脑功能的不良影响。

参 考 文 献

Creeley CE，Olney JW. 2010. The young: neuroapoptosis induced by anesthetics and what to do about it. Anesth Analg，110(2):442～448

Fütterer CD，Maurer MH，Schmitt A，et al. 2004. Alterations in rat brain proteins after desflurane anesthesia. Anesthesiology，100(2):302～308

Istaphanous GK，Loepke AW. 2009. General anesthetics and the developing brain. Curr Opin Anaesthesiol，22(3):368～373

Loepke AW , Soriano SG . 2008 .An assessment of the effects of general anesthetics on developing brain structure and neurocognitive function . Anesth Analg ,106(6):1681～1707

Moller JT , Cluitmans P , Rasmussen LS ,et al .1998 . Long-term postoperative cognitive dysfunction in the elderly ISPOCD1 study . ISPOCD investigators . International Study of Post-Operative Cognitive Dysfunction .Lancet ,351(9106):857～861

Newman S , Stygall J , Hirani S ,et al .2007 . Postoperative cognitive dysfunction after noncardiac surgery : a systematic review .Anesthesiology ,106(3):572～590

Nikizad H , Yon JH , Carter LB ,et al .2007 . Early exposure to general anesthesia causes significant neuronal deletion in the developing rat brain .Ann N Y Acad Sci ,1122(1):69～82

Patel P , Sun L . 2009 .Update on neonatal anesthetic neurotoxicity : insight into molecular mechanisms and relevance to humans .Anesthesiology , 110(4):703～708

撰稿人:祝胜美　王奎荣

浙江大学医学院附属第一医院

肢体和器官再生基因研究

Study on the Regeneration Genes of Limbs and Organs

由于疾病和外伤导致的肢体等器官缺失是对人类健康的极大危害，尤其是烧（创）伤常导致远端肢体如手指、脚趾及全层皮肤等器官的缺失，造成严重的外观与功能障碍。采用自体/异体器官移植（例如自体皮片移植修复深度烧伤创面，异体器官移植替代缺损的肾脏、肝脏等）、组织工程技术、干细胞技术等均存在相应的不足与缺陷，如自身供体来源有限、会在供皮区存留瘢痕，组织工程皮肤无法完整替代皮肤附属器，而异体器官移植存在免疫排斥反应等。如果能在缺失部位原位再生肢体或器官，则可克服目前各种方法存在的不足和缺陷，有效提高患者的生存质量。

然而，人类肢体和器官再生似乎只是一个美好的愿望，在现实中并不存在。自然界中，只有极少数低等动物具有惊人的再生能力，比如蜥蜴能长出断了的尾巴、斑马鱼能再生出鳍。这些两栖类低等动物为什么具有神秘的再生能力，而哺乳动物包括人类却丧失了这种完美的自我修复功能？2005 年，《Science》杂志在其创刊 125 周年时把器官再生列为 21 世纪中的 25 个“大科学问题”之一，可见器官再生研究已引起广泛重视。近年来的研究表明，两栖类低等动物的自我修复来自于受损伤的肢体或器官局部存在的一些特殊的细胞，即未分化的原始细胞，这些细胞团聚集后形成胚基，胚基通过增殖、分化，从而精细地形成新的肢体或其他器官。一旦缺失这种胚基，则无法启动再生过程，仅形成畸形的上皮样组织。进一步研究发现，上述再生程序的启动受神秘的“再生基因”的调控。Mark T Keating 在《Science》杂志上发表论文指出，斑马鱼鳍的再生过程中，基因编码的信号分子 Fgf20a 对再生具有特殊作用，Fgf20 是 FGF 家族中新发现的成员，在癌细胞中高表达，可促进心肌细胞的增殖和分化，提高成体脑组织中神经元的存活。Fgf20a 在上皮细胞和间充质细胞边缘表达，从而启动了鳍的再生，并控制胚基形成。Fgf20a 功能缺失将导致再生功能的丧失，该研究为寻找和鉴定关键的再生基因奠定了基础。进一步的研究表明，除了 Fgf20a 外，HSPD1（heat shock 60kDa protein 1，热休克蛋白）和 MPS1（monopolar spindle 1，单极纺锤体）对于斑马鱼鳍和心肌组织的再生也是必需的。HSPD1 参与胚基形成和间充质干细胞的诱导、分化，而 MPS1 则对再生过程后期的快速细胞增生和向外伸展形成相应器官起重要作用。令人惊奇的是，在斑马鱼不同组织的再生过

程中，某些基因是相同的，如决定斑马鱼鳍的再生和心脏修复的基因，在视网膜光受体的再生中也发挥作用。这表明不论身体的哪部分受损，其再生机制可能由一种共同的基因控制。这为寻找特异性的“再生基因”密码，启动不同器官的再生程序提供了便利。

与斑马鱼、蜥蜴等低等动物的再生能力相比，自然界中的大部分动物包括人类却遗憾地丧失了这种功能。作为高等动物的人类是否也存在这种“再生基因”或是原本存在的这种基因已失去再生潜能？如果在人类也能发现这种神秘的基因密码，并重新启动再生程序，那么新的肢体与器官就能像指甲一样从人体内重新长出，将为烧（创）伤的治疗带来一场新的革命。从事再生医学的科研人员观察到，斑马鱼鳍再生所必备的两种基因 Fgf20 和 HSPD1 也存在于人体中，这表明人体确实存在“再生基因”，只是这些基因因各种原因已逐渐废退，不再发挥作用了。在人类胚胎的早期发育过程中，人体还具备奇迹般的愈合能力。如给母体内不超过 6 个月胎龄的胎儿手术，皮肤从功能与结构上均能完美康复，但随着婴儿逐渐长大，这种神奇的愈合能力也随之丧失。人类仅具备极少部分的再生能力，如残余肝脏的再生、血细胞的再生等。或许在未来的某一天能找到精确控制人类器官再生的基因密码，并重新启动再生程序，唤醒人类肢体和器官的再生功能。再生医学研究的进展使人们相信，这并不是遥不可及的梦想。研究人员已经首次使哺乳动物具备了部分再生能力，如下调“再生抑制基因”p21 的表达可使一种不具有再生能力的小鼠重新具备再生功能，能完整修复缺损的鼠耳。理论上分析，这个过程也同样适用于人类。或许某一天，我们可通过关闭再生抑制基因就可加速人类组织的修复过程，重新长出缺失的肢体。

然而，人类肢体和器官再生之路仍充满了困难和艰辛。首先，器官的再生需在再生基因的调控下，实现修复细胞增殖分化及有序的调控，而在人类，尚未发现确切的再生基因，不同的器官是否具有各不相同的再生基因？抑或是受同一再生基因控制？这些都是悬而未决的问题。其次，组织再生的生物学基础是在适宜的修复环境下，修复细胞增殖、分化与有序的调控。目前人们对再生微环境（niche，壁龛）的认识还非常少，如何提供相应的环境以利于干细胞团在受损部位进行分化、再生？况且肢体或其他器官的再生涉及来源于不同胚层的组织，如皮肤、神经、血管、骨等，如何协调这些不同的组织细胞增殖、分化，并再生出与损伤前同样的肢体或器官还缺乏有效的措施与方法。再次，低等动物器官原位再生需要损伤部位已经高度分化的细胞去分化（dedifferentiation）、增殖（proliferation）和再分化（redifferentiation）等特定的过程来完成，但在人类尚不清楚通过细胞的诱导分化能不能实现组织和器官的再生？尽管最近的研究表明，人体部分已分化的细胞可以去分化后形成干细胞或干细胞样细胞以及成体干细胞具有可塑性现象，但仍无法在断肢或器官损伤部位使分化成熟的细胞逆分化为具有

再生能力的干细胞团即胚基。最后，低等动物器官的再生源于胚基的形成及基底膜的崩解，而人类受损组织和器官迅速的纤维化也是妨碍器官再生的重要因素。损伤部位的快速纤维化修复是人类抗御外伤或其他疾病的保护性机制，但过度纤维化导致瘢痕形成，阻碍了再生过程。再生医学自 20 世纪 80 年代后期逐步振兴，得到迅速发展和重视，研究者正试图从低等动物的再生过程来探索人类肢体和器官再生的秘密，需进一步改变传统认识，从系统生物学、发育生物学和比较生物学领域去寻找人类肢体和器官再生的细胞、分子及基因机制，将有可能发现肢体和器官再生的基因密码，为维护人类的健康开创新的途径。

参 考 文 献

付小兵 . 2009 .组织再生 :梦想、希望和挑战 .中国工程科学 ,11(10):122～128

Bedelbaeva K , Snyder A , Gourevitch D ,et al .2010 . Lack of p21 expression links cell cycle control and appendage regeneration in mice . PNAS ,107(13):5845～5850

Brockes JP ,Kumar A . 2005 .Appendage regeneration in adult vertebrates and implications for regenerative medicine .Science ,310(5756):1919～1923

Qin Z ,Barthel LK ,Raymond PA . 2009 . Genetic evidence for shared mechanisms of epimorphic regeneration in zebrafish .PNAS ,106(23):9310～9315

Whitehead GG ,Makino S ,Lien CL ,et al .2005 . Fgfzo is essential for initiating zebrafish fin regeneration . Science ,310(5756):1957～1960

撰稿人:夏照帆　肖仕初

第二军医大学附属长海医院

寻找烧创伤后多器官功能障碍综合征的预警指标

Searching Predictors for Multiple Organ Dysfunction in Burn Trauma Patients

随着医学科学技术的发展，烧创伤的救治成功率已大幅度提高。但是，多器官功能障碍仍然是这类患者死亡的主要原因，统计表明多器官功能障碍综合征（multiple organ dysfunction syndrome，MODS）患者的病死率在 30%～50%。MODS 的概念是从“序贯性系统功能衰竭”这一名词逐步演化而来的。1973 年，Tilney 首次报道了远离损伤部位的器官可以发生功能衰竭，引起医学界的重视；1991 年，美国胸科医师学会和危重病医学会联合提出 MODS 的定义：严重创伤和（或）感染发生 24 小时后，出现两个或两个以上的器官功能障碍。MODS 发生发展的重要病理基础是全身性炎症反应，它的最终结局是重要生命器官的不可逆性功能衰竭。如果能够在疾病的早期筛选出那些有可能发生 MODS 的病人并给予及时干预，不仅能够减少治疗费用，而且能够降低 MODS 的发生率和死亡率。因此，寻找烧创伤后 MODS 的预警指标一直是国内外学者的研究热点和重点。

临床多中心研究表明全身性炎症反应与 MODS 的发生息息相关。由烧创伤或感染导致的局部炎症反应如果不能局限化，则大量的炎性介质进入血液循环，引起全身性炎症反应。目前已经发现的炎症介质有数百种之多，它们被粗略地分为促炎性介质（proinflammatory mediators）和抗炎性介质（anti-inflammatory mediators）两类。全身炎症反应引起 MODS 有两种途径：如果前炎性介质多于抗炎性介质，则炎症反应占主导地位，病人处于过度炎症反应状态，导致自身组织破坏，发生 MODS；如果抗炎性介质多于前炎性介质，抗炎症反应占主导地位，病人免疫功能低下，容易并发脓毒症，继而引起 MODS。以往的研究，有大量的工作是通过观察炎性介质的改变，预测 MODS 的发生。传统的炎性标志物 C-反应蛋白（CRP）、磷脂酶 A_2（PLA_2）和前降钙素原（PCT）等，均与 MODS 的发生有关。但是，CRP 和 PLA_2 特异性不高；PCT 不能同时满足预警指标敏感性和特异性的要求，如果取较小的域值则特异性降低，如果取较大的域值则敏感性降低。在细胞因子中，白介素-6（IL-6）、白介素-8（IL-8）、白介素-10（IL-10）、肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、白介素-1β（IL-1β）等均有一定意义。取适当的域值利用 IL-6 和 IL-8 可以预测 70% MODS 的发生。IL-10 作为重要的抗炎性介质一直受到重视，它抑制单核细胞功能，有报道认为它对预测

MODS 有一定意义，但是文献结果不一致。

由于全身炎症反应能够引起免疫功能的改变，从免疫细胞功能改变的角度寻找 MODS 的预警指标成为一个新的研究方向。目前已发现在创伤早期机体免疫功能就已经改变，免疫细胞产生促炎性介质的能力显著降低，这种改变预示可能发生 MODS。单核细胞作为重要的免疫细胞，既具有抗原提呈功能，又广泛参与各种免疫反应的调节，单核细胞表面存在的 HLA-DR 是一种主要组织相容性抗原 MHC-Ⅱ类分子，创伤后单核细胞表面 HLA-DR 降低，它表明病人处于免疫抑制状态，容易并发脓毒症，继发 MODS；严重烧伤患者单核细胞表面 CD47 荧光强度的降低也和 MODS 的发生相关。创伤后 T 细胞的功能也发生显著变化，辅助性 T 细胞（Th）亚群中 Th1 的功能被抑制，Th2 的功能增强，调节性 T 细胞（Treg）的数量也显著增加，结果使部分患者处于免疫抑制或者是免疫瘫痪状态。中性粒细胞（PMN）是炎症反应的关键细胞，它的数量和功能的改变与 MODS 的发生关系非常密切，创伤后 PMN 的促凋亡基因表达被抑制，PMN 数量增加；创伤也导致 PMN 活化，标志之一是血液中 PMN 弹性蛋白酶含量增加，其对外科患者预测 MODS 的敏感度为 88%，特异性为 83%。上述变化作为 MODS 预警指标的临床意义还不清楚，这方面的研究还需要积累更多的资料。

有鉴于目前的困境，人们把更多的希望寄托于应用现代分子生物学技术对烧创伤后机体的反应进行综合检测上。对严重创伤后血液中 T 细胞和单核细胞基因表达谱的测定显示，T 细胞刺激性受体 CD28、CD4、IL-2Rα 减少，细胞增殖率降低，单核细胞共刺激配体也减少。利用基因芯片检测技术对创伤后外周血中所有细胞的全基因表达进行综合分析显示，其表达特征与 MODS 的发生显著相关，至于是否能够作为预警指标需要进一步的临床研究。代谢组学是有可能给这项研究带来曙光的另一项技术。代谢组是指一个细胞、组织或器官中，所有代谢组分的集合，尤其指小分子物质。对创伤患者尿液的代谢组学分析证明，新发展的质谱分析方法适用于测定创伤引起的代谢变化。利用该方法测定 MODS 患者早期组织或体液中的小分子代谢产物，有可能作为 MODS 预警指标。其他的系统生物学方法，如转录组学和蛋白质组学等也有可能为解决这个难题提供有用的信息。应该指出，系统生物学方法所产生的庞大数据，需要从不同的角度反复验证才有可能找到合适的指标。

理想的预警指标应该具有良好的敏感性和特异性，同时又方便检测、费用低廉。而目前的烧创伤后多器官功能障碍综合征的预警指标离这一理想境界还有很大的距离。

参考文献

Baue AE. 2006. MOF, MODS, and SIRS: what is in a name or an acronym? Shock, 26(5): 438～449

Frink M, Griensven M, Kobbe P, et al. 2009. IL-6 predicts organ dysfunction and mortality in patients with multiple injuries. Scand J Trauma Resusc Emerg Med, 17: 49

Ghosh S, Dey DK. 2008. A unified modeling framework for metabonomic profile development and covariate selection for acute trauma subjects. Stat Med, 27(19): 3776～3788

Kirchhoff C, Biberthaler P, Mutschler W, et al. 2009. Early down-regulation of the pro-inflammatory potential of monocytes is correlated to organ dysfunction in patients after severe multiple injury: a cohort study. Crit Care, 13(3): R88

Laudanskia K, Miller-Grazianoa C, Xiao W, et al. 2006. Cell-specific expression and pathway analyses reveal alterations in trauma-related human T cell and monocyte pathways. Proc Natl Acad Sci USA, 103(42): 15564～15569

Maier B, Lefering R, Lehnert M, et al. 2007. Early versus late onset of multiple organ failure is associated with differing patterns of plasma cytokine biomarker expression and outcome after severe trauma. Shock, 28(6): 668～674

Miller AC, Rashid RM, Elamin EM. 2007. The “T” in trauma: the helper T-cell response and the role of immunomodulation in trauma and burn patients. J Trauma, 63(6): 1407～1417

Pacher R, Redl H, Woloszczuk W. 1989. Plasma levels of granulocyte elastase and neopterin in patients qith MOF. Prog Clin Biol Res, 306: 683～688

Wang GQ, Zhang Y, Wu HQ, et al. 2011. Reduction of CD47 on monocytes correlates with MODS in burn patients. Burns, 37(1): 94～98

Warren HS, Elson CM, Hayden DL, et al. 2009. A genomic score prognostic of outcome in trauma patients. Mol Med, 15: 220～227

撰稿人：夏照帆　王广庆
第二军医大学附属长海医院

人类分娩动因

Mechanisms of Parturition

自古以来，分娩在人类繁衍过程中担任了重要角色，然而分娩是如何发动的却一直是个谜。长期以来，人类分娩的发动机制一直备受关注，成为产科领域研究的热点问题之一。随着现代医学分子水平研究的不断深入，关于分娩发动机制的研究也得到不断推进。深入研究分娩发动的决定因素和机制对于揭示早产和过期妊娠的发生以及临床上采取相应干预措施起着重要的作用。尤其是早产儿带来巨大的家庭和社会经济负担，通过对分娩动因的研究有望探明早产的机制，进而采取措施积极预防早产发生，这对减少早产儿给家庭和社会带来的负担将起重要作用。

近年来，该领域研究的最大突破是人们意识到人类分娩发动不同于其他动物，具有一定的独特性，如人和黑猩猩有 95% 的基因序列相同，而有关生殖的基因是极大的不同之一。因此，借助于动物模型探讨人类的分娩发动机制只能获取有限的理论知识。有关人类分娩发动机制的研究进展概述如下：

1. 胎盘促肾上腺皮质激素释放激素触发分娩

系列研究证实，人类分娩发动与胎盘中促肾上腺皮质激素释放激素（corticotrophin-releasing hormone，CRH）基因表达和产生量相关。胎盘组织能够分泌产生 CRH 仅见于灵长类动物。在人类胎盘组织分泌产生的 CRH 量远远超过下丘脑，构成妊娠期母体外周血 CRH 的主要来源。母体血液中的 CRH 水平在妊娠期呈指数性升高，在分娩期达到高峰。CRH 循环结合蛋白（circulating binding protein for CRH，CRHBP）、糖皮质激素、雌/孕激素及 NO 等对胎盘中 CRH 的产生具有一定的调控作用。1998 年，Smith 提出胎盘 CRH 可能是分娩启动的生物钟，决定孕期的长短和分娩启动的时间。胎盘产生的 CRH 主要进入孕妇外周血液循环，少数会进入胎儿体内，CRH 主要通过和 CRH1 型受体结合发挥作用。孕妇 CRH 受体主要分布在垂体、子宫平滑肌和肾上腺等，在胎儿体内，CRH 受体主要见于垂体、肾上腺及肺。CRH 可促进胎盘、胎膜和蜕膜细胞前列腺素的释放、加强前列腺素对子宫的收缩作用及胎盘组织缩宫素的合成、子宫平滑肌缩宫素受体的表达等几种途径促进子宫收缩，因此，人类内源性 CRH 升高可以作用于母、儿的多种组织器官，最终导致分娩的发动。

2. 胎儿肾上腺系统在分娩发动中的作用

妊娠晚期胎儿肾上腺系统发育成熟后，分泌大量脱氢表雄酮硫酸脂和皮质醇，在促进自身成熟的同时，引发了胎盘内分泌的一系列变化，如雌激素的生成、胎盘 CRH 的分泌等。而胎盘分泌的 CRH 又作用于胎儿，促进其肾上腺系统分泌皮质醇，形成正反馈。同时，胎儿来源的糖皮质激素与分娩发动本身也有着直接的联系；而且胎儿肾上腺成熟后，糖皮质激素分泌的不断增加在分娩发动撤退理论及前列腺素生成过程中也扮演了重要的角色。糖皮质激素促进胎儿肺成熟的同时，表面活性蛋白 A 和磷脂等释放入羊水，促进胎膜的炎症反应。这些反应很可能是诱发分娩的关键因素，因此，胎儿肾上腺系统的发育成熟参与了分娩发动的重要环节，与分娩发动关系密切，见图 1。

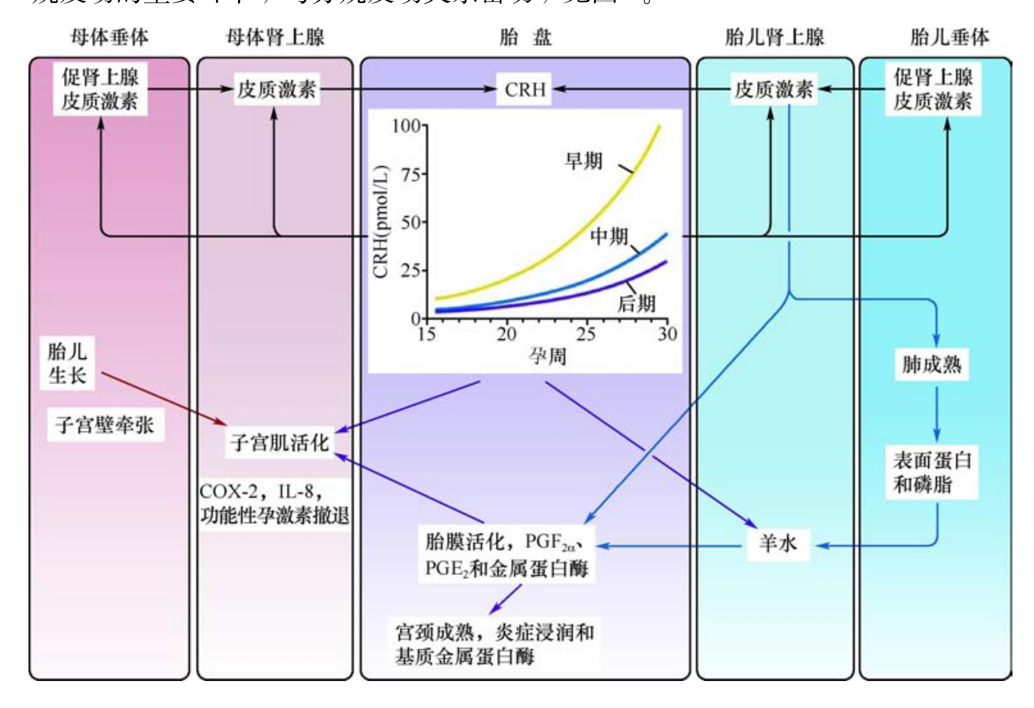


图 1　母体和胎儿内分泌系统对促胎盘 CRH 产生的作用

修改自 Roger Smith . 2007 . Parturition

3. 子宫平滑肌兴奋性“激活”

“收缩相关蛋白”包括一组参与子宫收缩调控的蛋白质，其表达变化是临产发动的重要调节因素之一，这一组蛋白质在妊娠大多数时间段处于相对静止状态，但可以通过下述途径促进节律性子宫收缩的启动：①增加肌动蛋白（actin）和肌球蛋白（myosin）的交互作用，引起平滑肌细胞收缩；②增加个体子宫平滑肌细胞的兴奋性；③促进细胞间的连接，保证子宫平滑肌的同步收缩。在多胎

妊娠早产时，子宫壁张力增加引起的平滑肌过度牵张从而收缩是其机制之一。

4. 炎症反应与分娩发动

近年来，细胞因子在分娩中的作用逐渐被认识并得以深入研究。研究显示，在足月妊娠和分娩过程中羊膜和绒毛膜蜕膜细胞可产生60多种细胞因子，如白介素（IL）-1α、IL-1β、粒细胞集落刺激因子（G-CSF）、前B细胞克隆增强因子（PBEF）、CXC趋化因子中的生长相关癌基因编码相关蛋白质-α、巨噬细胞抑制蛋白-1β（MIP-1β）、肿瘤坏死因子α（TNF-α）等。其中，促炎因子IL-1、IL-6、IL-8等对子宫的收缩性有一定的调节作用，与介导分娩发动有关。IL-1β能促进宫颈生成释放胶原酶和弹力蛋白酶，以降解宫颈胶原成分，促宫颈成熟。许多研究表明，在分娩过程中子宫组织、羊膜、蜕膜和绒毛膜组织中促炎因子表达水平中等程度升高。通过进一步深入研究发现，妊娠晚期抗炎细胞因子的“撤退”或功能转化促进炎症过程可能与分娩有关。且研究表明炎症因子的改变在触发分娩的级联反应中发生较早。早产时，感染激活炎症反应，并促进胎膜释放前列腺素，介导分娩发动。

总之，人类分娩发动调控机制十分复杂而且富有挑战性，除上述调控机制参与外，妊娠晚期宫颈软化成熟、孕激素撤退及胎儿下丘脑-垂体-肾上腺轴的调控等对人类分娩的发动也起到一定的作用，且互相联系，值得进一步深入探讨。解密人类分娩动因的道路仍将是曲折的。

主要难点：缺乏进行人类分娩动因研究的适当的动物模型；导致分娩发动各种假说的相互关联；临产前胎盘产生的CRH是怎样和其受体结合并进行分娩发动调控的。

参考文献

Condon JC, Jeyasuria P, Faust JM, et al. 2004. Surfactant protein secreted by the maturing mouse fetal lung acts as a hormone that signals the initiation of parturition. Proc Natl Acad Sci USA, 101:4978～4983

Hillhouse EW, Grammatopoulos DK. 2006. The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropinreleasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology. Endocr Rev, 27:260～286

Leung TN, Chung TK, Madsen G, et al. 2001. Rate of rise in maternal plasma corticotrophin-releasing hormone and its relation to gestational length. BJOG, 108:527～532

McGrath S, McLean M, Smith D, et al. 2002. Maternal plasma corticotropin-releasing hormone trajectories vary depending on the cause of preterm delivery. Am J Obstet Gynecol, 186:257～260

McLean M, Bisits A, Davies J, et al. 1995. A placental clock controlling the length of human pregnancy. Nat Med, 1:460～463

Ni X, Hou Y, Yang R, et al. 2004. Progesterone receptors A and B differentially modulate corticotropin-releasing hormone gene expression through a cAMP regulatory element. Cell Mol Life Sci, 61: 1114～1122

Smith R. 2007. Parturition. N Engl J Med, 356: 271～283

撰稿人：杨慧霞　朱毓纯

北京大学第一医院

胚胎的着床机制

The Mechanism of Implantation

1. 背景

胚胎的着床是指胚胎种植于子宫内膜中，是生殖过程的关键步骤。胚胎着床涉及胚胎发育、胚胎与子宫间的相互识别和相互作用及子宫内膜接受胚胎的能力。子宫内膜只有一个短暂的时间允许胚胎种植，这个时期被称为着床窗口期，子宫内膜适应这一功能变化出现一系列结构和生化指标的改变，在这一过程中有多种因素起作用，这些功能变化共同影响子宫接受胚胎种植的能力，也称子宫内膜容受性。随着辅助生殖技术的成功发展，生殖过程中的配子质量、受精过程和早期胚胎情况人类均可在体外进行观察，而由于子宫内环境难以模拟，着床过程成为各国科学家研究的热点和难点问题。

2. 科学意义

避孕及不孕是生殖医学工作者面临的两大挑战，由于女性内分泌有着周期性的变化，也使其研究更加复杂。20 世纪科技迅猛发展，各种避孕措施研制和辅助生育技术的诞生，使人类在生殖医学上取得了长足的进展，但避孕失败和辅助生育技术治疗成功率低的问题仍困扰着广大研究者，这些都与胚胎形成后子宫内膜容受性的微观改变不为人类所知有关。子宫内膜容受性研究已成为探讨人类生殖奥秘的关键切入点。

3. 最新进展

胚胎形成后，子宫内膜仅有一个短暂的时间允许胚胎种植，这段时间通常被认为在排卵后的 5～7 天，这个时期被称为着床窗口期（the implantation window），这一时期是子宫内膜的一个特殊的功能时期，其结构和生化指标均有重要的改变，这一过程进而又可分为三个连续的步骤，即黏附、侵入和胎盘形成，首先组织学发生改变，其次雌、孕激素及其受体，还有多种细胞因子、黏附分子、酶类等都有相应的变化。以往人们根据 Noyes 分期来评价子宫内膜，如果子宫内膜组织学分期较正常月经周期推迟两天以上称为黄体功能不全（luteal phase defect，LPD），发生黄体功能不全的妇女由于子宫内膜与胚胎发育不同步而导致胚胎着床失败。近年在细胞形态学研究方面，胞饮突（pinopode）作为评价子宫内膜容受性的指标已被众多学者所接受。它是植入窗期子宫内膜上皮细胞膜顶端出现的大而平滑的膜突起，透射电镜下，胞饮突是上皮细胞顶端的胞质突

起，内含细胞器、囊泡和糖原颗粒，出现在正常排卵后的第 6～9 天，持续不到 48 小时。子宫内膜中胞饮突的表达受雌、孕激素的共同调节。

在着床这一连续功能变化的过程中存在多种因子的变化，这一变化不仅体现在组织形态学变化方面，而且雌、孕激素及其受体也受到广泛重视，近二十年众多研究发现多种细胞因子、黏附分子、酶类等在着床窗口期发生变化。整合素是其中最重要的着床期分子标志，最早 Lessey 等用免疫组化的方法研究了整合素在月经周期子宫内膜上的表达，发现在子宫内膜上皮细胞中整合素表达与月经周期有关，其中 $\alpha v\beta_3$ 出现在黄体中期（正常月经周期的 20 天开始，即着床窗口的开启），$\alpha 4\beta_1$ 表达于正常月经周期的 14～24 天（即着床窗口的关闭），其出现与胚胎黏附时间相一致。另一个着床相关的重要黏附分子是骨桥蛋白（osteopontin，OPN），其分子中含有特异的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸（Arg-Gly-Asp，RGD）序列——细胞黏附结构域，该序列在不同物种的 OPN 中都普遍存在，是其发挥黏附功能的结构基础，如果缺失或变异，将丧失促黏附功能。OPN 在生殖中的作用主要表现为：①在妊娠期间，OPN 是子宫内膜的主要成分，在子宫胎盘之间的黏附和细胞信号转导中发挥作用；②OPN 在子宫间质细胞中广泛表达，可促进子宫蜕膜化及胚胎侵入子宫；③OPN 可促进子宫和胎盘组织分泌多种细胞因子，有利于胚胎顺利着床及妊娠的维持。白血病抑制因子（leukemia inhibitory factor，LIF）也是一种与着床密切相关的多肽生长因子，因在小鼠孕第 4 天子宫内膜 LIF 表达量最高，而非孕小鼠不表达 LIF，这使大家认识到 LIF 在胚胎着床中所起的重要作用。在人类，LIF 的表达和定位主要在分泌中晚期子宫内膜腺上皮细胞中，说明其与着床的重要关系。除了胚胎与子宫内膜间的黏附，胚胎着床的关键还在于胚泡对着床位点细胞外基质的降解，基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinase，MMP）催化细胞外基质降解，人体子宫内膜分泌 MMP 与月经发生、内膜重建、排卵、胚胎植入等有关。目前已知的对着床有意义的 MMP 很多，它们所起的作用不尽相同。

胚胎成功地着床于子宫内膜除了与子宫内膜的形态、功能变化有关，还与囊胚和内膜上皮间相互影响的三维变化有关。Carver 等研究显示，囊胚单细胞着床于子宫内膜后即开始具有 hCG 分泌功能。Mercader 等报道，体外受精治疗中赠卵者进行囊胚和子宫内膜上皮共培养后，着床率和妊娠率提高。进一步的研究结果显示共培养的囊胚分泌更多的 IL-6，说明这可能与囊胚着床有关。与囊胚体外接触后的子宫内膜细胞芯片研究结果显示妊娠启动的分子通道开启，最后在囊胚和滋养细胞共培养中发现侵入相关的信息。

着床无疑是一个复杂而细致的过程，在这个过程中包含着一系列分子生物学改变，各种细胞因子、黏附分子、激素、酶类等通过相互作用才能完成着床这一过程，其中的任何一个或几个环节发生障碍，都会导致着床失败或异常着床。在

今后的研究中，除围绕着床机制进行动物实验研究外，更重要的是围绕临床实际问题，通过基础实验方法进行着床失败的机制研究，以便更好地解决临床实际问题。

主要难点：

(1)胚胎着床涉及胚胎发育、子宫内膜容受性及胚胎与子宫间的相互识别和相互作用，有多种因子参与，是一个复杂的过程。

(2)子宫内膜也只有一个短暂的时间允许胚胎种植，这段时间通常被认为在排卵后的5～7天，这个时期被称为着床窗口期。

(3)子宫内膜容受性的建立是胚泡成功植入的决定因素，而体外研究模型难以建立。

(4)体外研究结果在体内得到证实。

参考文献

陈小芳,杨彦,刘云,等.2007.降调节后激素预测体外受精周期中卵巢反应性.中国妇幼保健,22:3692～3694

Bancsi LF, Broekmans F, Eij Kemans M, et al. 2002. Predictors of poor ovarian response in in vit ro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. Fertil Steril, 77:328～336

Bancsi LF, Huij SAM, Denounden CT, et al. 2000. Basal follicle stimulating hormone levels are of limited value in predicting ongoing pregnancy rate after in vitro fertilization. Fertil Steril, 73:552～557

Boivin J, Bunting L, Collins JA, et al. 2007. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. Hum Reprod, 22: 1506～1512

Douglas R. 1995. Danforth Endocrine and paracrine control of ocyte development. Am J Obstet Gynecol, 172(2):747～752

Johannes L H Evers, Evers MD, Peronneke Slaats MS, et al. 1998. Elevated levels of basal estradiol-17β p redict poor response in patients with normal basal levels of follicle-stimulating hormone undergoing in vitro fertilization. Fertil Steril, 69(6):1010～1014

John Y Phelps, Adam S Levine, Timothy N, et al. 1998. Day 4 estradiol levels predict pregnancy success in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation for IVF. Fertil Steril, 69(6):1015～1019

Mitwally MFM, Bhakoo HS, Crickard K, et al. 2006. Estradiol production during controlled ovarian hyperstimulation correlates with treatment outcome in women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. Fertil Steril, 27

Smotrich DB, Widra EA, Gindoff PR, et al. 1995. Prognostic value of day 3 estradiol on in vitro fertilization outcome. Fertil Steril, 64(6):1136～1140

Yacoub Khalaf, MRCOG, Alison Taylor et al. 2000. Low serum estradiol concentrations after five days of controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization are associated with poor outcome. Fertil Steril, 74(1):63～66

撰稿人:乔　杰　李　蓉

北京大学第三医院

胚胎干细胞的定向分化

The Oriented Differentiation of Embryonic Stem Cell

1. 背景

胚胎干细胞（embryonic stem cell，ES 细胞）是从着床前胚胎（孕 3～5 天）的内细胞群分离得到的、能在体外培养的一种高度未分化的细胞（图 1）。ES 细胞能被诱导分化为构成机体的任一种细胞类型，可用于临床细胞、组织和器官的修复和移植治疗，研究 ES 细胞的定向分化有着重要的理论和应用价值。

自 1981 年英国剑桥大学的 Evans 和 Kaufman 用延缓着床的胚泡、美国加州大学旧金山分校的 Martin 用条件培养基分别成功地分离、体外培养了小鼠的胚胎干细胞以来，ES 细胞的研究就一直是各国研究的热点。

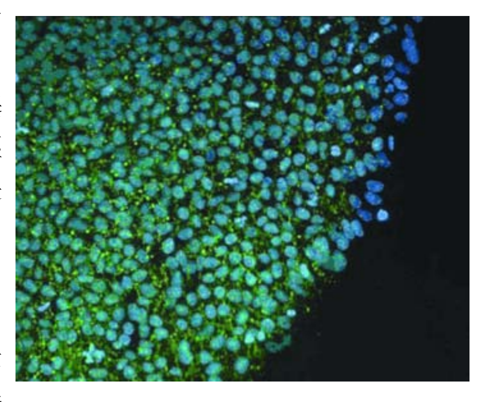


图 1　人类胚胎干细胞

2. 科学意义

人的寿命在不断延长，但终有极限。随着年龄的增长，各个器官都在不断老化，女性的卵巢是第一个彻底衰老的器官，随后，甲状腺、关节和心脏等各种器官都步入退化以致衰竭的进程，非生命的人工器官作用有限；另外，外伤、肿瘤等因素可以造成人体在生理衰老之前的器官功能衰竭。因此，高度组织相容的、全功能的、有生命的替代器官能够在医学领域产生革命性的突破。主要作用：

(1) 研究哺乳动物发育生物学的模型。

(2) 疾病治疗：定向诱导分化的 ES 细胞是细胞、组织甚至器官移植供体的理想来源。

(3) 新药的研制与开发。

3. 最新进展

目前干细胞研究的重点：干细胞未分化和多向性机制的基础研究，干细胞向特定细胞群体分化的调控和分化细胞的应用研究，而后者是连接基础研究和临床研究的必经之路。过去几年中，已有一系列关于人胚干细胞向多种特定细胞如肝

细胞、心肌及神经上皮等主要细胞系列分化的报道。

(1) 肝细胞：同种异体肝脏移植仍然是终末期肝病和代谢性肝病最有效的治疗方式，胚胎干细胞向肝脏细胞的定向分化使其可能成为肝脏细胞移植的一个重要细胞来源。2005年，Takumi T等报道ES细胞不经过拟胚体阶段在诱导因子作用下直接分化为有功能的成熟肝细胞，并移植到小鼠肝损伤模型体内。

(2) 心肌细胞：诱导人类胚胎干细胞定向分化为心肌细胞可为心肌梗死、心肌坏死等重大心脏疾病患者实施细胞治疗，也可作为种子细胞，用于构建供器官移植用的人造心脏。2001年，以色列科学家Kehat等将人类ES细胞悬浮培养分化为心脏收缩样心肌细胞团，其具有早期心肌细胞的结构和功能。2004年报道，克隆小鼠的干细胞可以通过形成细小血管的心肌细胞修复心衰小鼠的心肌损伤，这是首次显示克隆干细胞在活体动物体内修复受损组织。

(3) 造血细胞：成体造血干细胞（HSC）移植是现今应用得最普遍的细胞移植治疗。2008年，Pearson等在ES细胞的发育过程中用细胞因子结合BMP-4进行处理，可以强有力地促进造血分化，诱导形成的造血祖细胞可以产生红系和髓系衍生物。人类造血干细胞的分化途径见图2。

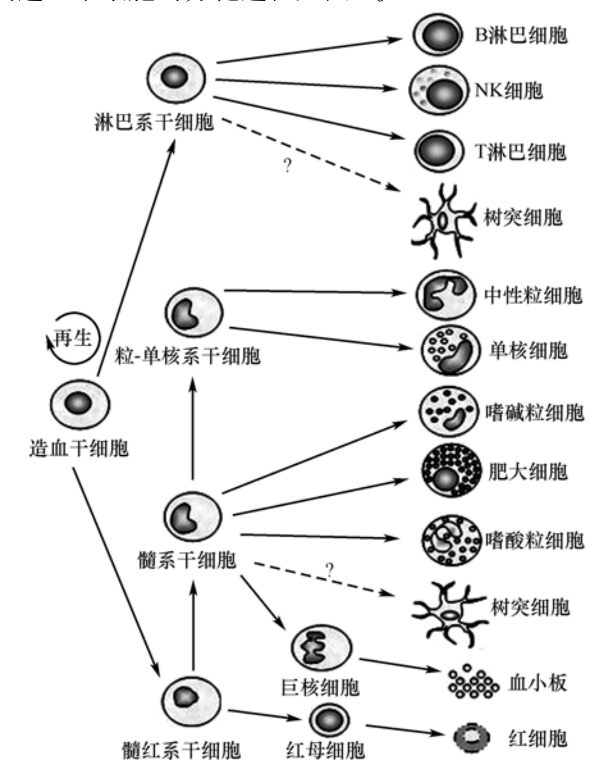


图2 造血干细胞的分化途径

（4）成骨细胞：ES 细胞可作为骨组织工程种子细胞的来源，可采用在培养基中添加不同的化学物质，或与特殊细胞或组织共培养的方法诱导分化 ES 细胞，使 ES 细胞向成骨细胞分化，进而有效地促进 OCN 和 ALP 基因的表达。

（5）胰岛素分泌细胞：糖尿病是一种常见的内分泌代谢紊乱疾病，胰岛移植是治疗 1 型糖尿病和 2 型糖尿病重症患者的有效方法之一。2004 年，Segev 等通过 Nestin 阳性细胞的筛选将人的胚胎干细胞诱导分化为胰岛素分泌细胞。

目前，ES 除了可以分化为上述细胞外，经过人们的不懈努力，还可在体外诱导分化为角质形成细胞、内皮细胞、滋养层细胞、脂肪细胞、上皮细胞、视网膜前体和软骨细胞、神经细胞、生殖细胞等多种细胞类型。

4. 主要难点

胚胎干细胞定向分化的难点主要包括两个方面：

（1）定向分化的问题：由于胚胎干细胞具有分化成人体各种细胞、组织和器官的能力，因此，如果能够诱导其定向分化，即不形成一个完整的人体，而是发育成某一个我们希望的器官或组织，再结合体细胞克隆技术，那么就可以在实验室中，以工厂化的方式为任何人生产出任意的器官和组织。目前的研究停留在甲基化诱导、定向分化促进基因的调控及相应因子环境等几个方面，但还没有取得有意义的进展。

用干细胞治疗疾病有三种方式：把一种成体组织的干细胞移植给相应被损坏的组织，目前的成果主要停留在这一方式，且临床应用极其有限；把胚胎干细胞定向分化为所需的细胞，然后把细胞移植给需要的病人，目前尚停留在实验室阶段；在体外进行器官克隆，进行器官移植，目前只具有理论上的意义。

面临的挑战：定向诱导分化 ES 细胞为特定类型的功能细胞；定向诱导分化 ES 细胞为有功能的器官；需要解决移植免疫排斥反应的问题。

（2）伦理学担忧：胚胎干细胞的定向分化研究在中国刚刚起步，如何建立合理、有遵循的伦理规范细则是主要的难点问题。

研究胚胎干细胞的临床应用，一定会触及体细胞克隆技术，也一定会损坏人类早期胚胎，这种研究会不会发展为生殖性克隆、是不是对人类胚胎的亵渎、是不是侵犯人权等，国际科学界对此类伦理道德之争论十分激烈。国家人类基因组南方研究中心伦理委员会的专家们认为，人类胚胎干细胞研究在遵循“行善和救人、尊重和自主、无伤和有利、知情同意、谨慎和保密”的伦理原则下，赞同“对 14 天以内的人类胚胎可以用于实验研究”的观点。根据 2003 年 12 月中国科学技术部和卫生部联合发布的《人胚胎干细胞研究伦理指导原则》第五条规定：用于研究的人胚胎干细胞只能通过四种方式获得。①体外受精时多余的配子或囊胚；②自然或自愿选择流产的胎儿细胞；③体细胞核移植技术所获得的囊胚和单性分裂囊胚；④自愿捐献的生殖细胞。

由于定向分化的障碍，完整人体的克隆（即生殖克隆）要远远简单于生成器官，因此，从技术的发展角度，生殖性克隆的成功一定先于器官分化，其对于人类社会的影响是不容低估的。我国政府明令“禁止进行生殖性克隆人的任何研究”。1999 年，美国国家生命伦理学顾问委员会（NBAC）在《克隆人：伦理考虑》报告中列举了反对生殖性克隆的 6 种论证：潜在的生理伤害、个性的丧失、危及家庭幸福、对传统社会价值的冲击、生命商品化和滑向优生运动。

此外，如果有朝一日器官合成真的可以成功，人类的寿命必将大大延长，这本身也是会对人类社会造成巨大冲击的事件。单个器官可能不会有什么伦理障碍，但器官组合呢？如果一个人的大部分器官需要更换，也就是克隆并生产，那么与克隆人有什么分别。大脑又如何？大脑的功能是人与其他生物，以及人与人区别的根本，大脑能否再造和更换？

鉴于以上情况，人们呼吁：在支持胚胎干细胞研究的同时，必须遵循严格的伦理规范；任何涉及人体的胚胎干细胞研究从立项到成果都要经过严格的伦理评估和监督；相关科研机构应尽快建立并完善伦理委员会，就胚胎干细胞研究中的伦理问题，加强科学家、伦理学家、政策制定者和法学家之间的对话交流；开展对媒体从业者和公众的相关教育培训，从而进一步推动人类胚胎干细胞研究，为 21 世纪生命科学的发展做出贡献。

参考文献

胡安斌，蔡继业.2004.ES 细胞体外定向分化为成熟肝细胞的实验研究.生物化学与生物物理进展，31(6)

蒋芳萍，张晓刚.2009.成熟心肌细胞诱导胚胎干细胞定向分化为心肌样细胞.中国病理生理杂志，25(5)：1030～1033，1037

Assady S，Maor G，Amit M，et al，2002.Insulin production human embryonic stem cell.Diabetes，50：1691～1697

Bowles KM，Vallier L，Smith JR，et al.2006.HOXB4 overexpression promotes hematopoietic development by human embryonic stem cells.Stem Cells，24：1359～1369

Evans MJ，Kaufman MH.1981.Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.Nature，292(5819)：154～156

Hamazaki T，Iiboshi Y，Oka M，et al.2001.Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro.FEBS Lett，497(1)：15219

Kehat I，Kenyagin2karsenti D，Snir M，et al.2001.Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes.J Clin Invest，108(3)：407～414

Madonna R.2008.Myocardin a enhances telomerase activities in adipose tissue mesenchymal cells and embryonic stem cells un-dergoing cardiovascular myogenic differentiation.Stem

Cells ,26(1):202～211

Pearson S ,Sroczynska P ,Lacaud G ,et al. 2008.The stepwise specifica-tion of embryonic stem cells to hematopoietic fate is driven by se-quential exposure to Bmp4, activinA, bFGF and VEGF.Development ,135:1525～1535

Takumi T, Hanako Y, Kazuhiko A ,et al. 2005.Direct hepatic fate specification from mouse em-bryonic stem cells.Hepatology ,41(4):836～846

撰稿人:郁　琦[1]　李晓霞[2]

1 北京协和医院

2 大连市妇产医院

胎儿多种出生缺陷的无创伤性产前诊断

The Non-invasive Prenatal Diagnosis of Birth Defect

1. 背景

产前诊断（prenatal diagnosis）是指在胎儿出生前用各种方法诊断胎儿是否患有某种遗传病或先天性疾病的一种手段，对于预防及控制新生儿出生缺陷具有十分重要的临床意义。目前，传统的产前诊断主要是通过羊膜穿刺术、绒毛取样、经腹脐静脉穿刺、胎儿活组织检查等途径取得胎儿细胞或遗传物质，进行细胞培养及核型分析或分子遗传学分析，以实现相关出生缺陷的产前诊断等。这些方法都需要有创伤性地进入宫腔才能取得胎儿的遗传物质，对孕妇和胎儿均具有潜在的损伤性。羊水穿刺、绒毛取材的操作均有1/200～1/100引起胎儿流产的概率，此外，还存在胎盘出血、宫内感染等其他不良反应。至于脐血穿刺和胎儿镜检查的不良反应发生率更高。所以，临床医生们一直在寻找针对各种常见出生缺陷实现无创性产前诊断的可能方法，来取得更好的产前确诊的效果，同时避免目前现有技术的各种并发症。

2. 科学意义

母体外周血中胎儿细胞的发现为非创伤性产前诊断提供了新的途径。在妊娠期，一些胎儿细胞会通过胎盘少量地进入母体血液循环系统。通过对这些胎儿细胞的富集、分离和鉴定，以及提取DNA后进行PCR扩增或FISH检测，可应用于X连锁隐性遗传病、某些常染色体异常及宫内感染等的产前诊断，母亲外周血中胎儿细胞用于产前诊断的优点在于能直接反映胎儿情况，且不对孕妇及胎儿造成明显的危害。但是母体外周血中胎儿细胞数量极少，细胞的分离、纯化和鉴定技术难度大、稳定性差，能否经过培养得到胎儿有核红细胞的克隆及具体培养条件等问题仍存在分歧，且多应用于男胎妊娠的产前诊断病例，存在较大的局限性。在这种情况下，随着孕妇外周血中较多存在着胎儿游离DNA这一现象的揭示，越来越多的研究转向通过外周血中胎儿游离遗传物质（DNA、mRNA）进行无创产前诊断这一领域，并取得了一系列重要的进展。我国香港学者Lo等认为母血浆游离胎儿DNA比完整细胞中提取的胎儿DNA更有意义，其主要原因在于与完整细胞相比，游离胎儿DNA有较高的浓度，且分娩后母血浆中游离胎儿DNA迅速被清除，不受以往妊娠的影响，假阳性率极低。因此，母血中胎儿DNA以其无创伤性、安全、简便等特点有希望能被应用于产前诊断的许多方面，

如性别鉴定、RhD 血型鉴定、X 连锁的单基因病的检测、胎儿非整倍体及先兆子痫预测等的研究。

3. 最新进展

目前利用外周血中胎儿游离 DNA 或 mRNA 进行无创产前诊断的研究工作主要集中于以下几个方面：

（1）母循环中胎儿 DNA 的来源：孕妇外周血中胎儿核酸的来源尚未阐明，目前对母血浆中游离胎儿核酸的来源主要有三种假设，一是胎儿造血细胞通过胎盘进入母体循环并被免疫系统破坏，胎儿 DNA 进入母血中；二是来源于胎盘；三是来源于各种凋亡细胞。最近越来越多的研究认为胎盘是母循环中游离胎儿核酸的主要来源，进一步的研究表明游离 DNA 通过胎盘的转运是不等的，提示胎儿游离 DNA 可能来源于凋亡的绒毛滋养层细胞。还有研究发现母血浆中游离胎儿核酸以凋亡小体的形式存在，因此，有人推测母血浆中游离胎儿 DNA 可能来源于胎儿发育过程中各种凋亡的胎儿细胞。

（2）选择和富集游离胎儿 DNA：母血浆中含有游离胎儿 DNA 成分，但目前特异的胎儿 DNA 标记物较少，因此，只有在胎儿所含的致病 DNA 与母体不同时才能检测出来，限制了其在临床中的应用。尽管相对完整细胞而言孕妇血浆中游离胎儿 DNA 较丰富，但其仅占母血浆 DNA 总量的 3%～6%，而无创伤性产前基因诊断在临床的广泛应用依赖于较高浓度的游离胎儿 DNA 及胎儿 DNA 的特异性标记。这两年来有些学者开始了这方面的研究。

1）游离胎儿 DNA 的富集和扩增：除利用胎儿与母亲的游离 DNA 大小的不同可富集胎儿 DNA 外，目前较广泛应用于胎儿 DNA 的扩增和检测分析的方法主要是 PCR 技术（包括巢式 PCR 技术、引物延伸预扩增技术和荧光定量 PCR 技术等），近年来质谱分析法（MS）也被应用于胎儿 DNA 的检测。

2）胎儿特异性标记：利用胎儿特异性标记 Y 染色体，可进行早期的产前性别鉴定，为部分男胎妊娠的 X 连锁遗传病的诊断提供了可能性。有研究通过对印记基因 IGF2-H19 单核苷酸多态的研究，显示母亲和胎儿的 DNA 分子的甲基化是不同的，用该表观遗传标记可辨别母血浆中母亲遗传给胎儿的 DNA。Chim 等证明了 maspin 基因在胎盘中是低甲基化的，而在孕妇外周血细胞中则是超甲基化的，即胎盘和造血细胞中 maspin 的甲基化模式不同。Chim 应用甲基化特异 PCR 技术证明了孕妇血浆中低甲基化的 maspin 序列在分娩后迅速被清除，此外，他还通过单核苷酸多态（single nucleotide polymorphism，SNP）基因分型进一步证实低甲基化的 maspin 序列含有胎儿 SNP 基因型。这些数据说明表观遗传标记可用于产前诊断，是胎儿特异性的遗传标记。此外，STR 和 SNP 也是胎儿区别于母亲的很好的遗传标记。总之，人们利用各种各样的手段发展一些女性胎儿同样可用的胎儿特异性标记，如常染色体 DNA 多态、胎儿表观遗传标记和

定量来源于胎盘的 mRNA 转录子的表达等。

（3）胎儿 DNA 在临床产前诊断中的应用：目前最有可能取得突破性进展的应用领域为多种遗传病的产前诊断。

1）性连锁遗传性疾病：通过检测孕妇血浆中胎儿 DNA 可以准确地鉴定胎儿性别，这为进一步诊断胎儿是否患有性连锁遗传性疾病提供了依据。目前进行无创性产前诊断胎儿性别的方法主要集中在对孕妇血浆中 Y 染色体特异性 DNA 片段的检测。有研究表明，运用巢式 PCR 技术检测 SRY 基因特异性序列，敏感性和特异性均高达 100%。此外，也有学者采用多重荧光 PCR 反应技术检测胎儿 DNA 的短串联重复序列，进行无创性产前诊断胎儿性别。

2）胎儿溶血病：新生儿溶血病是由母体体内含有针对红细胞上父源性抗原的抗体所致，严重时导致胎儿宫内死亡。Rijnders 等采用实时定量 PCR 法检测孕妇血浆中胎儿 RhD 基因的类型，敏感性接近 100%，特异性为 97%，可以用于新生儿溶血病的无创性产前诊断。

3）21-三体综合征：21-三体综合征是一种常见的染色体病，新生儿发病率为 1/800 左右，可以通过对孕妇血浆中游离胎儿 DNA 数量的异常来诊断胎儿是否患有 21-三体综合征。Lo 等用 Y 染色体特异性实时定量 PCR 检测孕妇血浆中游离胎儿 DNA，发现妊娠 21-三体胎儿的孕妇血浆中有高浓度的胎儿 DNA 存在。有研究以 Y 染色体特异性基因（DYS1）作为胎儿 DNA 的标志物，利用实时定量 PCR 法扩增 DYS1 基因，检测男性胎儿 DNA 的水平，结果发现妊娠 21-三体胎儿孕妇血浆中胎儿 DNA 的水平较正常胎儿高。

4）其他：近来，Chiu 等通过检测孕妇血浆中胎儿 DNA 对 β_2 重型地中海贫血成功进行无创性产前诊断。此外，利用孕妇血浆中胎儿 DNA 可以成功诊断的遗传性疾病有强直性肌营养不良、软骨发育不良、囊性纤维病、亨廷顿病、先天性肾上腺增生等。

总之，利用孕妇血浆中的游离胎儿 DNA 进行产前诊断，对胎儿没有创伤性，可在孕早期做出诊断，是目前无创性产前诊断的研究热点。此项技术不仅简单快速，适用于临床诊断，而且由于出生后孕妇血浆及血清中的胎儿 DNA 能够快速清除，不受前次妊娠的影响，对判断本次胎儿情况有重要价值。利用外周血中胎儿游离 DNA 和 RNA 进行无创性产前诊断技术的研究具有很好的应用前景。

4. 主要难点

利用母外周血中胎儿特异性游离遗传物质进行产前诊断所面临的主要难点在于游离胎儿 DNA 的富集和扩增技术还需要进一步完善，提高其富集技术的效率和稳定性，提高扩增的特异性；此外，还需要继续寻找更有特异性的胎儿基因位点标记和表观遗传学位点标记。进一步扩大临床有需求的各种遗传病产前诊断种类，建立可用于临床的稳定的无创产前诊断技术路线。对于常见的胎儿染色体异

常如 21-三体等，需要进一步完善无创产前诊断的诊断模型，提高诊断率，降低假阳性和假阴性率，进一步体现无创性产前诊断技术在临床应用的重要意义。

参考文献

Bianchi DW, 2004. Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential. Placenta, 25 (Supp lA): S93～S101

Chim SS, Tong YK 2005. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. Proc Natl Acad Sci USA, 102(41): 14753～14758

Galbiati S, Smid M, Gambini D, et al. 2005. Fetal DNA detection in maternal plasma throughout gestation. Hum Genet, 117(2～3): 243～2481

Li Y, Zimmerman B, Rusterholz C, et al, 2004. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. Clin Chem, 50: 1002

Lo YM, Lau TK, Zhang J, et al, 1999. Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. Clin Chem, 45(10): 1747～17511

Lo YM, Leung TN, Tein MS, et al. 1999. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. Clin Chem, 45(2): 184～1881

Rijnders RJ, Christiaens GC, Bossers B, et al, 2004. Clinical applications of cell - free fetal DNA from maternal plasma. Obstet Gynecol, 103(1): 157～1641

Tungwiwat W, Fucharoen G, Ratanasiri T, et al, 2003. Noninvasive fetal sex determination using a conventional nested PCR analysis of fetal DNA in maternal plasma. Clin Chem Acta, 334(1～2): 173～1771

撰稿人：边旭明　蒋宇林
北京协和医院

子痫前期的发病机制

Pathogenesis of Preeclampsia

1. 背景和研究进展

妊娠期妇女发生高血压即为妊娠期高血压疾病，它在正常妊娠妇女中的平均发病率为5%～10%，在我国为9.7%，略高于美国等发达国家（5%～7%），特别是东北地区，受寒冷刺激的影响发生率高达20%。按照美国国家高血压教育工作组（national high blood pressure education program，NHBPEP）2000年的分类，妊娠高血压疾病可分为五种类型，包括：①子痫前期（preeclampsia，根据血压与尿蛋白的定量又分为轻度和重度）；②妊娠期高血压（gestational hypertension）；③子痫（eclampsia，包括产时/产前/产后子痫）；④慢性高血压（chronic hypertension）；⑤慢性高血压基础上的子痫前期（preeclampsia superimposed on chronic hypertension）。其中临床上对母儿危害最大的是子痫前期和子痫，特指妊娠20周以后出现高血压并伴随蛋白尿、水肿、头晕等，继发颅内病变、抽搐甚至昏迷。这一疾病在世界范围内都是产科临床上导致孕产妇死亡的第二位主要原因，据统计，无论在发展中国家还是发达国家，10%～20%的孕产妇死亡都与其有关，尤其是孕34周前发生的早发型重度先兆子痫（early onset preeclampsia）。由于重度子痫前期和子痫发病急，临床上又缺乏预测诊断的指标，一旦发现，立即终止妊娠仍是目前首选治疗方案，但由于发病孕周早，多数患者在终止妊娠时是早产，因此围生儿病率和死亡率很高。另一方面，对于病情较轻的患者，产科多采用降压、解痉等措施，保胎至妊娠36周后引产或剖宫产，但由于子宫血管痉挛引起的胎盘供血不足等因素，易造成胎儿宫内发育迟缓，分娩后胎儿需要特殊的护理，这又给患者家庭以及社会带来许多直接和间接的经济负担。

尽管在两千年前就有了关于这一疾病的描述，但迄今由于病因学无法得到阐明，子痫前期仍被称为一种“理论性疾病”。近百年来，经过国际生殖生物学和医学界学者们的努力，形成了子痫前期病因的多种学说，主要有滋养层浅表植入学说、胎盘损伤学说、免疫学说、凝血与纤溶系统失调学说、肾素-血管紧张素-醛固酮学说、遗传学说等，这些学说分别从不同的生理学角度阐释了子痫前期复杂的病理变化，但仍然不能从根本上阐释其发病机制。

对子痫前期胎盘的病理学分析表明，其滋养层细胞分化发生障碍，表现为滋养层细胞对子宫内膜的浸润非常浅表，同时滋养层细胞向内皮细胞表型的转换不完

善，致使子宫螺旋动脉尤其是肌层螺旋动脉改建不完善，母-胎界面上滋养层细胞持续处于缺氧的状况。高通量基因芯片分析亦证实缺氧所诱导的胎盘基因表达模式的改变与子痫前期患者胎盘中的情形相似。同时，子痫前期胎盘中细胞发生过度凋亡，也是胎盘功能障碍的病理因素之一。越来越多的证据促使学者们逐渐认同子痫前期的胎盘功能障碍学说，即胎盘发育过程的障碍引起子宫血管重建不完善，导致胎盘受到过度的氧化应激刺激，这种病理性胎盘将向母体循环释放一些可溶性分子，导致母体多脏器的血管功能受损，引发高血压、蛋白尿等症状。

近年来有关 sFlt-1 和 sEndoglin 的研究成果有力地支持了这一学说。已发现子痫前期患者血清中，sFlt-1 和 sEndoglin 水平显著增高；sFlt-1 被证实是来源于胎盘，体外实验发现 sFlt-1 抑制血管内皮细胞形成管状结构，而 VEGF 和 PlGF可抵抗 sFlt-1 的这种抗血管形成的作用；在妊娠大鼠中导入外源 sFlt-1 或 sEndoglin 基因，可导致类似子痫前期的多种症状。由于血清 sFlt-1 水平的升高发生于 PE 症状出现之前 5 周，同时伴有 VEGF 和 PlGF 水平下降；血清 sFlt-1 和 PlGF 的这种变化在早发重度子痫前期患者中尤为明显；虽然在大多数中度 PE 患者中，sFlt-1 水平并不与子痫前期发生直接相关，但这些分子仍可望成为临床上早期预测子痫前期（尤其是早发重度子痫前期）发生的重要标志。

综合子痫前期研究的重要进展，Roberts 等近年来提出了子痫前期的“两阶段理论”，其主要观点为：子痫前期病理变化的第一阶段主要体现为妊娠早期胚胎植入/胎盘发育产生一定程度的障碍，导致母-胎界面上炎症反应增强，血流灌注减少；这些早期的病理变化与母体的一些遗传和（或）环境因素相互作用，导致第二阶段的病理变化，即母-胎界面和母体本身血管功能障碍，胎盘发育受阻，母体多脏器功能损伤。这一异常的妊娠结局对胎儿和母体的远期发育都有较大程度的影响，主要体现为对心血管系统和代谢系统的影响。这一理论将胚胎/胎盘因素与母体因素结合起来，为综合考虑子痫前期的发病因素提供了新思路。

2. 主要难点

针对子痫前期这一产科重大难题，目前国际上面临的重大挑战是：如何实现科学的早期预测、诊断和干预治疗，以最大限度地降低疾病对孕妇生命的威胁，并获得最低可能性的围生病死率。

近 10 年来，子痫前期有关的研究已经取得了一些令人欣喜的成果。但目前仍然未能实现对这一疾病的早期预测和诊断，鉴定子痫前期血浆特异性标志分子组合仍然是研究的重点所在。

另一方面，病理学研究虽然发现一些相关分子在胎盘发育、血管发生等环节的作用机制，遗传学的研究也发现了一些相关的母体遗传因素，然而，胚胎植入和胎盘发育早期的何种异常决定了妊娠后期子痫前期的病理症状？母体的遗传和表观遗传因素怎样参与早期胚胎植入/胎盘发育关键信号通路之间的调控和相互

作用？这些仍是子痫前期发病机制研究中的难点。

此外，子痫前期患者的病情非常复杂，患者的病情轻重和急缓、发病阶段、临床表征等都有很大的差异。这一方面可能有一定的个体差异因素，但更重要的可能是不同类型子痫前期的发病机制有所差异，也给研究者提出了新的挑战。

世界卫生组织（WHO）在 2001 年启动了为期 15 年的“攻克子痫前期/子痫的全球项目”（Global Program to Conquer Preeclampsia/Ecalmpsia），旨在通过世界性的科技合作，在子痫前期流行病调研、临床干预、诊断和治疗方案、病因学/发病机制的基础研究等方面加以突破，力争在 20 世纪攻克这一痼疾。21 世纪，各项科学技术得到了飞速发展，学科之间的交叉也使越来越多的问题找到了崭新的解决方案。面对新的机遇和挑战，相信通过各个领域研究者的通力合作，这一困扰人类千余年的难题终将被攻克。

参考文献

Levine RJ, Lam C, Qian C, et al. 2006. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. N Engl J Med, 355: 992～1005

Levine RJ, Maynard SE, Qian C, et al. 2004. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. N Engl J Med, 350(7): 672～683

Maynard SE, Min JY, Merchan J, et al. 2003. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. J Clin Invest, 111(5): 649～658

Redman CW, Sargent LL, 2005. Latest advances in understanding preeclampsia. Sciences, 308: 1592～1594

Roberts JM, Pearson G, Cutler J, et al. 2003. Summary of the NHLBI working group on research on hypertension during pregnancy. Hypertension, 41(3): 437～445

Roberts JM, Hubel CA, 2009. The two stage model of preeclampsia: variations on the theme. Placenta, 30(Suppl A): S32～S37

Soleymanlou N, Jurisica I, Nevo O, et al. 2005. Molecular evidence of placental hypoxia in preeclampsia. J Clin Endocrinol Metab, 90(7): 4299～4308

Working Group of the National High Blood Pressure Education Program. 2000. Report on high blood pressure in pregnancy. Am J Obstet Gynecol, 183: S1～S22

Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ, 1997. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype, One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? J Clin Invest, 99: 2152～2164

撰稿人：王雁玲
中国科学院动物研究所

多囊卵巢综合征不仅仅是生殖问题

Polycystic Ovary Syndrome Is Not Only a Reproductive Problem

多囊卵巢综合征（polycystic ovary syndrome，PCOS）是一种常见的妇科内分泌疾病，患病率为 6% ～8% ，其主要特点为排卵障碍、高雄激素征和卵巢多囊样改变，约有 30% 的不孕症患者患有 PCOS。PCOS 不仅影响女性的生殖健康，还与妇科肿瘤和一系列代谢性疾病关系密切。研究表明，PCOS 女性发生子宫内膜癌和卵巢癌的风险明显增加，其 2 型糖尿病、高血压及心脑血管疾病等远期并发症的风险也高于一般人群，而且这种高风险会持续到绝经后，这些均与慢性排卵障碍、高雄激素症、胰岛素敏感性减低、肥胖和血脂异常等有关。随着不良环境因素影响、生活方式的改变以及对疾病认识和早期检出率的提高，多囊卵巢综合征发病率在世界范围内呈上升趋势。实际上，PCOS 已经超出妇产科疾病的范畴，被公认为一种累及全身、危害女性终身健康的内分泌代谢性复杂疾病。

PCOS 的病因和病理生理机制尚不清楚，现在普遍认为它是一种易感基因与环境因素共同作用而致的复杂疾病。随着现代生物医学研究技术的发展，聚合链酶反应技术、人类全基因组测序和一些基因检测技术的发展，寻找致病基因成为各种有遗传倾向疾病的研究热点。在过去的十余年里，许多学者对性激素调节、激素合成及胰岛素敏感性等方面的一系列候选基因进行了筛查，发现脂联素基因、胰岛素受体基因、钙激活酶基因等与 PCOS 的胰岛素作用有密切关系。最近有研究发现血管紧张素转化酶基因、GDF9、IL-6 基因、纤维蛋白 3 基因和血浆血小板激活因子乙酰水解酶基因与 PCOS 易感性相关，而 BMP15、AMH、AM-HR2、CYP21、TNF-α、IL-10 与 PCOS 发病并无相关性。PCOS 的易感基因研究较多，但目前尚未发现明确的 PCOS 致病基因，因此有待于大样本更深层次的研究。而且 PCOS 是导致不孕的重要原因，主要患者群为女性，目前尚未发现明确的男性表型，这就使研究者难以获得较大的家系，进一步的遗传学研究也难以展开。再加上环境因素的干扰，使病因研究更是难上加难。

PCOS 作为一种复杂的内分泌代谢性疾病，其表型具有高度异质性，危害主要表现在生殖和代谢方面。在对 2100 例中国人 PCOS 患者进行分析，发现不同月经类型所占比率不同，其中 31.2% 为闭经，63.8% 为月经稀发，5% 为月经规律；68% 有卵巢多囊样表现；多毛占 31.7% ，痤疮占 18.5% 。上述特点的发生率因种族不同而存在差异，而且并不是所有患者都存在同样的临床表现，不同表

型的患者其内分泌和代谢损害程度并不相同。胰岛素抵抗是指胰岛素效应器官或部位对其转运和利用葡萄糖的作用不敏感的一种病理生理状态，它是PCOS重要的病理生理状态，在PCOS的发生和发展中发挥重要作用。50%～70%的PCOS患者存在胰岛素抵抗和高胰岛素血症。胰岛素抵抗和高胰岛素血症与雄激素过量关系密切，可导致卵泡的发育和成熟障碍，形成小卵泡及发育中的卵泡闭锁，而无排卵或排卵稀发。而且缺少排卵后孕激素对抗，长期高雌激素环境可刺激子宫内膜发生不同程度的增生，使患者子宫内膜癌风险明显增加。此外，胰岛素抵抗也是糖尿病的重要特征，且与代谢综合征、心血管疾病等远期并发症关系密切。研究证实，代谢综合征、高血压和2型糖尿病等代谢性疾病在PCOS妇女中发病率高于一般人群。血脂异常也是PCOS患者常见的代谢异常表现之一，其类型和异常程度有所不同。大量研究发现PCOS妇女的HDL-C下降而三酰甘油和LDL-C升高。并且高LDL-C多伴有雄激素水平的升高或是一级亲属LDL-C水平的升高，这表明基因或环境可能有一定的影响。

此外，约有50%的PCOS妇女伴发肥胖。虽然这一比例和肥胖程度在不同种族和地域的人群中有所差异，但其在PCOS中的发生率要显著高于对照人群。而且肥胖不仅仅是一种现有症状，更是一种远期风险。前瞻性研究证实，PCOS患者发生肥胖的风险也要高于正常女性。肥胖可以进一步加重PCOS女性的代谢和生殖异常，而且家系研究还表明肥胖会诱导出易感人群的PCOS表型。

由此可见，PCOS的表型多种多样，但并不是所有患者都会表现出所有表型，这也给构建动物模型和病理生理研究带来很大的困难。关于病因，虽然已有多种假说，如肾上腺起源学说、胎儿雄激素过量学说等，但目前尚无法在动物实验中得到充分证实。PCOS表现的高度异质也使疾病的严格诊断陷入困境和争议；此外，不同表型都对个体患者近期和远期健康的危害程度不同，因此在治疗上，很难形成一个国际上普遍接受的治疗共识。由于缺乏满意的动物模型，使某些相关研究（如某些药理学研究）也受到阻碍。

总之，由于PCOS病因和发病机制的复杂性和临床表现的多样性，使对该病的研究以及临床诊断和防治措施的规范化仍面临着巨大的挑战，例如PCOS的致病基因研究、制定适合中国人的PCOS诊断标准、早期有效干预措施、长期健康的管理等。值得庆幸的是，近年来我国在流行病学调查、病因病理研究、临床诊治规范化等方面已经取得了可喜的成绩。相信在不久的未来，会对令人困惑的PCOS揭开更多的谜！

参考文献

陈子江，石玉华，赵跃然，等.2004.胰岛素受体基因多态性与多囊卵巢综合征发病的关系.中华妇产科杂志，39(9)：582～585

刁兴华,石玉华,高芹,等.2008.钙蛋白酶10基因多态性与多囊卵巢综合征患者糖耐量及脂代谢异常的相关性.中华妇产科杂志,43(2):106～109

徐兴华,谭迎春,石玉华,等.基于鹿特丹标准诊断的多囊卵巢综合征患者月经类型及其意义.中华医学杂志,89(37):2604～2606

Azziz R, Carmina E, Dewailly D, et al.2009. The androgen excess and PCOS society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report.Fertil Steril,91(2):456～488

Ewens KG, Stewart DR, Ankener W, et al. 2010. Family-based analysis of candidate genes for polycystic ovary syndrome.J Clin Endocrinol Metab,95(5):2306～2315

Fan P, Liu HW, Wang XS, et al. 2010. Identification of the G994T polymorphism in exon 9 of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase gene as a risk factor for polycystic ovary syndrome. Hum Reprod,25(5):1288～1294

Karabulut A, Turgut S, Turgut G.2010. Angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism in patients with polycystic ovary syndrome. Gynecol Endocrinol, 26(6): 393～398

Shi Y, Gao X, Sun X, et al.2008. Clinical and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome without polycystic ovary: a pilot study on Chinese women. Fertil Steril,90(4):1139～1143

Yildiz BO, Knochenhauer ES, Azziz R. 2008.Impact of obesity on the risk for polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab,93:162～168

Zhang N, Shi YH, Hao CF, et al.2008. Association of +45G15G(T/G) and +276(G/T) polymorphisms in the ADIPOQ gene with polycystic ovary syndrome among Han Chinese women. Eur J Endocrinol,158(2):255～260

撰稿人:陈子江　石玉华

山东大学附属省立医院

人类卵巢功能衰退的机制

The Mechanisms of Ovarian Failure in Mankind

人类卵巢功能衰退导致排卵、生育功能终止，成熟期特有的周期性月经停止，妇女绝经。了解卵巢功能衰退的机制，不仅可以推动生殖科学的进步，而且对促进妇女2/3生命阶段的健康医学的发展也有重要意义。据我国卫生部于2009年发布的卫生统计数据，2007年年龄为35～59岁的妇女在我国总人口中占19.92%，这正是受卵巢功能衰退影响的年龄段，面对这么庞大的人群，关注卵巢功能衰退及其相关健康问题，研究其进展和机制就显得格外重要。

对卵巢功能衰退机制的研究也是一个探讨妇女绝经机制的问题。对绝经机制的研究集中在两方面：绝经的进化论机制和卵巢功能衰退所涉及的分子机制。前者反映了对生存环境的适应，后者主要涉及种属的遗传问题。

通过对物种的比较研究已获得大量的证据，表明妇女绝经的发生是进化的产物。与非灵长类动物相比，妇女生殖衰老明显早于其他器官组织。与非人类多种灵长类的比较，发现三种现象仅与人类关联密切，即人类妇女的绝经发生在中年，而其他灵长类发生在晚年；人类哺乳停止较早；人类寿命更长，因此绝经后生存时间长得多。在进化中出现的这三种情况，目的是为提高生殖的效/价比。进化论的研究始于20世纪50年代，进化的一个动力是为避免生育危险。争论持续，有两种观点：母亲作用或祖母作用，来解释为什么人类绝经普遍发生在中年。综合各种因素之后，发现祖母理论更能说明人类绝经现象。男性在绝经进化中的作用是对进化论机制研究的另一方面。

生殖生理过程是受下丘脑-垂体-卵巢（HPO）轴严密控制的。既往观点认为在人类生殖衰老过程中卵巢起主导作用，甚至认为卵巢功能衰退是发生在卵巢的独立事件；目前认为卵巢功能衰退这一事件很可能是发生在HPO轴的所有水平上，卵巢和脑都是启动妇女绝经的关键性调节器，对该方面的详细情况并不了解。

人类卵巢功能衰退不是一个事件，而是一个连续、渐进，又呈阶段性特征的进展过程。生殖衰退的研究国际上始于20世纪50年代，90年代以后关注度加强，目前仍然是热点。已有多个大型、前瞻性研究从宏观角度观察生殖衰退的进程，其中关于衰退过程的分期系统虽然已在临床上应用，但是仍有许多问题尚待进一步探讨。

导致绝经的最直接原因是卵巢内卵母细胞数的减少，这是一个与年龄有联系的演变过程，与发生绝经这一进化事件之间有什么联系？这是一个被关注的问题。卵母细胞减少的过程从胚胎期开始，出生时携带的卵母细胞池供出生后生命所用，不可能再增加，只会按某种方式减少，当卵巢内的卵母细胞数少至约1000个时，妇女绝经。对卵母细胞数减少过程的研究，主要有两个不同的结果。一个是在1992年发表的“折棍”现象，其关键点为，大约在38岁（折棍拐点）时，卵母细胞数减少的速度明显加快。另一个是于2008年发表的稳加速现象，该研究克服了以往研究中方法学上的许多问题。采用现代立体学技术，对来自一个研究室的、取自122名0～51岁女性的卵巢，计数其非生长状态卵泡。形成一个新的模型：幂函数模型。该模型指出，卵母细胞减少的速度随年龄的增长而加快，不存在拐点现象。但是该模型也存在一些不足，比如，如何预测某一位妇女的生殖期限？研究还在继续，要点是还要考虑添加影响绝经年龄的种种因素。

对人类遗传机制目前了解很少，对卵母细胞数减少涉及的详细分子机制关注度仍很不够。在大鼠的研究中发现一系列与卵巢发育有关的基因。临床病理情况（各类性腺发育不全，如Turner综合征和POF等）表明功能健全的X染色体是卵巢正常发育所必需，已提出了与若干基因可能有关。p53基因与编码LIF（leukaemia-inhibiting factor）基因之间的联系是最值得关注的。在小鼠中已发现p53基因功能在雌性中降低较雄性要早8个月，p53基因可能上调LIF基因影响生殖衰老的过程。基因与绝经年龄之间的联系正受到重视，比如ApoE（apolipoprotein E）。基因的遗传变异可能影响白人妇女自然绝经年龄等。对大鼠的研究还表明，适中剂量的TNF-α能诱导卵母细胞凋亡，剂量过高或过低均不产生影响。动物试验已表明，bcl-2的过表达或给予激活素（activin A）可使个体出生时携带更多的卵母细胞，而青春期卵母细胞数无改变，提示这两种蛋白物质可能使卵母细胞闭锁率增加；处于较高闭锁率状态中的卵母细胞群质量较差，提示可以通过一个积极的干预来减少质量差的卵母细胞数。

绝经年龄范围跨度大，从40～60岁，这种明显的个体差异表明，对卵巢功能衰退的影响因素很多，如营养好、多产等可以使绝经推后，而吸烟等则可使绝经提前。在吸烟妇女，发现其卵泡液中过氧化/抗氧化作用比值升高，卵母细胞线粒体基因丢失累积增加，据称这些也可能是导致卵巢衰老提前的重要途径。

卵巢功能衰退的影响因素很多，尚缺乏机制研究，建议从流行病学研究中发现易感因素，从临床绝经发生的个体性及卵巢早衰的问题，追溯源头的病因和解决临床相关问题。

参考文献

Cant MA, Johnstone RA. 2008. Reproductive conflict and the separation of reproductive genera-

tions in humans .Proc Natl Acad Sci ,105 :5332～5336

Hansen KR ,Knowlton NS ,Thyer AC ,et al . 2008 . A new model of reproductive aging : the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause .Hum Reprod ,23 :699～708

He LN ,Recker RR ,Deng HW ,et al . 2009 . A polymorphism of apolipoprotein E(APOE) gene is associated with age at natural menopause in Caucasian females . Maturitas ,62(1):37～41

Hu W , Feng Z , Atwal GS ,et al . 2008 . p53 : a new player in reproduction .Cell Cycle ,7 :848～852

Kuhle BX . 2007 .An evolutionary perspective on the origin and ontogeny of menopause .Maturitas ,57 :329～337

Liu PY ,Lu Y , Robert R ,et al . 2010 . ALOX12 gene is associated with the onset of natural menopause in white women .Menopause ,17(1):152～156

Liu PY ,Lu Y , Robert R ,et al .2010 . Association analyses suggest multiple interaction effects of the methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms on timing of menarche and natural menopause in white women .Menopause ,17(1):185～190

Longa JR ,Shu XO ,Cai QY ,et al .2006 . Polymorphisms of the CYP1B1 gene may be associated with the onset of natural menopause in Chinese women .Maturitas ,238～246

Rashidi A ,Shanley D . 2009 .Evolution of the menopause : life histories and mechanisms .Menopause ,15 :26～30

Ricklefs RE . 2008 .The evolution of senescence from a comparative perspective . Funct Ecol ,22 : 379～392

撰稿人:林守清

北京协和医院

子宫内膜异位症发病机制的研究及其临床意义

Pathogenesis of Endometriosis and Its Clinical Significance

子宫内膜异位症（endometriosis，EM）在育龄妇女中有 10%～15% 的发病率，且有明显上升趋势，有“现代病”之称。80% 的子宫内膜异位症患者伴有盆腔疼痛，50% 合并不育，严重影响中青年妇女健康和生活质量。子宫内膜异位症发病机制复杂、病变广泛、形态多样、极具侵袭和复发性，有诸多棘手的诊断、治疗问题。

1885 年，Von Rokitansky 首次描述该病。1921 年，Sampson 提出了经血逆流种植学说，成为主导理论。亦有上皮化生学说、远处转移学说、苗勒管残迹学说等，但都未臻完善。特别是经血逆流见于 90% 的育龄妇女，几乎是生理现象，而罹患子宫内膜异位症的却只有 10%～15%，故 Sampson 学说遭到质疑。对此，学者们又提出遗传、炎症、免疫、激素等因素在发病中的作用，争论不辍。

1. 子宫内膜异位症的发病机制

(1) 子宫内膜异位症发病的“3A”模式：在子宫内膜异位症病灶的形成过程中，经血逆流种植应达到四个“必须”。①经输卵管逆流入盆腔的经血中必须含有子宫内膜组织；②内膜碎片中的腺上皮和间质细胞必须是“活的”；③这些细胞必须有能力种植在盆腔组织器官上；④盆腔子宫内膜异位症病灶的解剖分布与经输卵管播散的方式必须一致（图 1）。而且，逆流之内膜需突破“三道防线”：腹水中的炎症因子、腹腔中的免疫细胞和腹膜的细胞外基质。经相关组织病理和分子生物学研究表明，子宫内膜异位症形成需经黏附、侵袭、血管形成之“三部曲”，可将其称为“3A”程序（attachment-aggrassion-angiogenesis）。黏附是异位内膜“入侵”盆腹腔腹膜或其他脏器表面的第一步，继而突破细胞外基质，血管形成是其种植后生长的必要条件，亦即所谓“生根、生长、生病”的“三生”过程。“3A”程序还可明晰解释及描述子宫内膜异位症的临床病理表现，即早期的红色病变、典型黑色病变及后期白色病变。

(2) 在位内膜决定论：近十年来的基础研究聚焦于子宫在位内膜，在位内膜于其中起重要作用，所谓“在位内膜决定论”。即不同人（罹患或不患子宫内膜异位症）逆流经血中的内膜碎片能否在“异地”黏附、侵袭、生长，在位内膜的差异是根本原因，是发生子宫内膜异位症的决定因素。诸多研究结果表明，子宫内膜异位症患者的在位内膜在组织形态和超微结构方面显现出更活跃的功能，更

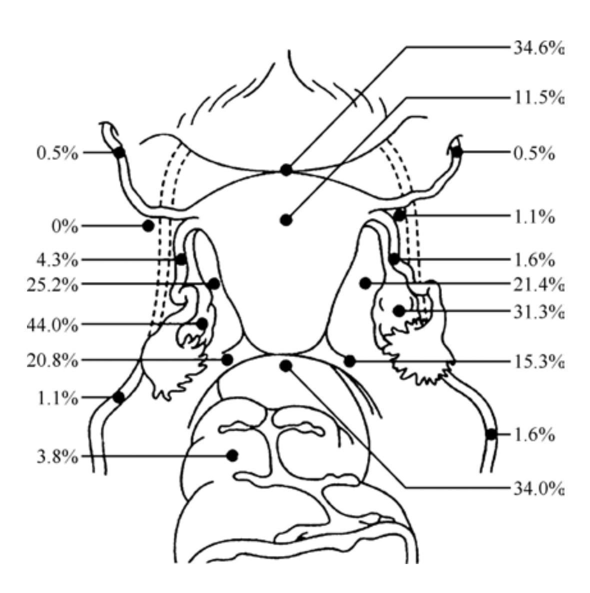


图1　子宫内膜异位症病灶的盆腹腔分布

强的血管增生、迁徙和侵袭能力。研究还表明，子宫内膜异位症患者的在位内膜逆流入盆腹腔后，通过自分泌和旁分泌机制，表现出主动改造周围环境以利其生长的强大能力。上述研究结果提示，具有内在差异的在位子宫内膜是子宫内膜异位症形成中的决定因素，而激素影响、免疫反应和局部微环境是附加因素，抑或只是继发表现，而决定“内膜命运”的关键系子宫在位内膜本身。

(3)新近子宫内膜异位症发病研究的热点与难点——在位子宫内膜干细胞：随着整个医学及生物学界对干细胞研究的深入，近来对子宫内膜干细胞的研究开始受到关注。作为对“在位内膜论”的发展和补充，有学者提出子宫内膜干细胞可能是发生子宫内膜异位症的根源，即在位子宫内膜基底层的干/祖细胞发生改变或异常脱落，进而逆流入盆腔，在局部微环境的刺激诱导下进入增殖、分化程序，最终发展成子宫内膜异位病灶。

众所周知，子宫内膜是具有高度更新能力的组织，在每个月经周期中都能由0.5～1mm增厚到5～7mm；绝经后萎缩的子宫内膜仍具完整的激素反应能力和增生活力，且内膜腺体密度并不下降；子宫内膜切除术后的少数患者内膜能完全再生而且再次妊娠。这些临床现象提示子宫内膜存在干/祖细胞驱动它进行快速增生和重建工作。新近研究发现，子宫内膜中确有少数细胞具有强大的增殖潜能、克隆形成能力和多向分化潜能。目前普遍认为，子宫内膜干/祖细胞位于内膜的基底层，或者说是内膜与肌层的交界部位。

基于上述新近研究结果，再回顾子宫内膜异位症的相关研究后发现，子宫内膜异位病灶与子宫内膜基底层的组织学构成和激素受体表达方式非常近似。而子

宫内膜异位症患者经血内膜碎片 ER、PR 和 P450A 的表达类型及组织形态学特征与基底层内膜也一致。由此推测，正常情况下不随经血剥脱的基底层内可能含有导致子宫内膜异位症发病的真正“祸首”。而位于子宫内膜基底层的干祖细胞随即成为子宫内膜异位症发病机制研究的新热点。最新的国内外研究越来越关注干细胞与子宫内膜异位症发病之间的联系，但相关的研究尚显缺乏，故需要大量的工作进行深入开展对此予以证实。

（4）目前子宫内膜异位症干细胞假说研究的难点及解决策略：关于子宫内膜异位症的在位内膜干细胞起源假说的验证，研究难点亦是重点主要集中在三方面。①对在位内膜干细胞的分离鉴定，寻找特异性标志物，通过检测异常脱落的内膜干细胞协助临床诊断；②对子宫内膜异位症患者和非内异症者在位内膜干细胞的分子生物学特性和表型进行比较分析，寻找病因；③对子宫内膜异位症患者在位内膜干细胞所在的微环境进行研究。后续研究主要基于“在位内膜决定论”和“干细胞起源假说”，对子宫内膜异位症患者在位内膜干细胞及其微环境进行分析，并与正常女性内膜进行比照，探寻患者在位内膜干细胞的异常生物学特征，寻找可用于早期诊断的敏感指标，以及相应的治疗策略。

2. 对子宫内膜异位症发病机制认识及研究的临床意义

子宫内膜异位症的病理类型多样，临床表现复杂多变，极具侵袭和复发性，具有恶变潜能，使临床诊疗时时陷入困顿，成为难治之症。尽管现已初步建立子宫内膜异位症的临床诊疗策略，但时下仍旧面临疼痛与不育治疗效果不佳的问题，子宫内膜异位症术后或停药后复发率高的问题，深部子宫内膜异位症的处理问题，子宫内膜异位症恶变的问题，以及子宫内膜异位症早期诊断的问题。这些问题的解决最终有赖于对发病机制的洞悉，而子宫内膜异位症的临床基础研究热点始终是围绕亟待解决的临床问题展开的。

1998 年的魁北克国际子宫内膜异位症学术会议提出，子宫内膜异位症是遗传性疾病、炎症性疾病、免疫性疾病、出血引起的疾病、器官（子宫）依赖性疾病、激素（雌激素）依赖性疾病。十年过去，现在更倾向于认为它是一种子宫内膜疾病、干细胞疾病（图 2）。迄今，子宫内膜异位症的诊断和治疗逐渐集中到对于子宫内膜的认识和干预上。利用分子生物学、基因芯片、蛋白质组学等技术发现子宫内膜异位症患者在位内膜中有多种差异基因和蛋白质，已开发针对在位内膜的子宫内膜异位症检测标志物，可称得上是“源头诊断”。此外，左炔诺酮宫内缓释系统在子宫内膜异位症治疗中的临床应用，亦可视作“源头治疗”。与此同时，基于对“3A”发病模式认识的深入，以抗血管形成为目标的“靶向治疗”在动物模型中已得到初步肯定，相关药物临床试验亦被纳入考虑。

迄今，子宫内膜异位症的基础理论研究和临床诊治实践都有了令人欣喜的进展，但仍有诸多问题未能解决，还要应对随着新的诊疗手段和药物使用出现的新

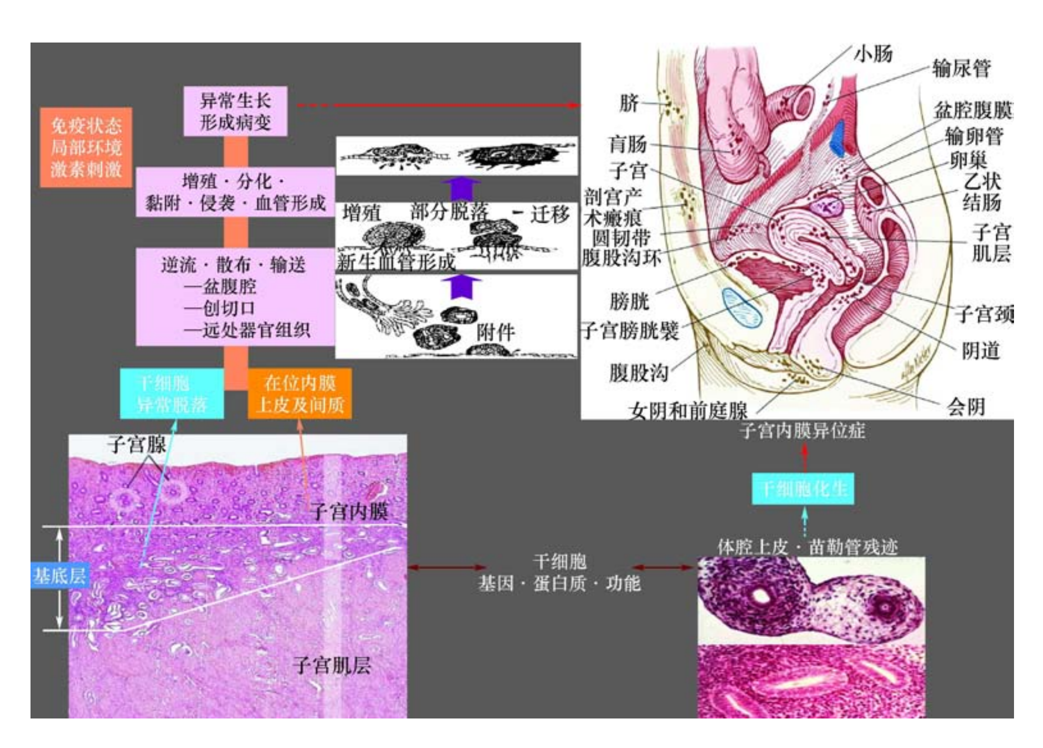


图2　子宫内膜异位症病因学观点："3A"模式-在位内膜决定论-在位内膜干细胞起源

问题。是挑战，也是契机，更需要我们从临床到基础进行深入全面的思索与探究。

参 考 文 献

郎景和.2003.子宫内膜异位症的基础与临床研究(第一卷).北京：中国协和医科大学出版社

郎景和.2009.关于子宫内膜异位症的再认识及其意义.中国工程科学,11(10):137～142

郎景和.2010.子宫内膜异位症研究的深入和发展.中华妇产科杂志,45(4):241～242

王姝,郎景和.2008.子宫内膜异位症——一种干细胞疾病.现代妇产科进展,17(10):721～724

Al-Jefout M,Andreadia N,Tokushige N,et al.2007.Apolit study to evaluate the relative efficacy of endometrial biopsy and full curettage in making a diannosis of endometriosis by the detection of endometrial nerve fibers.Am J Obstet Genecol,197(6):578.e1～e4

Forte A,Schettino MT,Finicelli M,et al.2009.Expression pattern of stemness-related genes in human endometrial and endometriotic tissues.Mol Med,15(11～12):392～401

Masuda H,Matsuzaki Y,Hiratsu E,et al.2010.Stem cell-like properties of the endometrial side population:implication in endometrial regeneration.PLoS One,5(4):e10387

Sah G,Zhang Y,Zhang C,et al.2009.Elevated levels of gremlin-1 in eutopic endometrium and peripheral serum in patients with endometriosis.Fertil Steril,91(2):350～358

Sasson IE, Taylor HS. 2008. Stem cells and the pathogenesis of endometriosis. Ann N Y Acad Sci, 1127: 106～115

撰稿人：郎景和
北京协和医院

HPV 导致宫颈癌之谜

How Human Papilloma Virus (HPV) Causes
the Development of Cervcal Cancer

作为最常见的妇科恶性肿瘤之一，宫颈癌每年在全球约有 50 万新发病例和 23 万死亡病例，严重威胁着妇女的健康和生存。随着宫颈癌各种筛查方法和技术的发展，越来越多以大规模人群为基础的流行病学资料显示，人乳头状瘤病毒（human papilloma virus，HPV），尤其是高危型 HPV 感染是发生宫颈癌的主要风险因素，德国癌症研究中心的科学家 Harald zur Hausen 亦因首次发现 HPV 导致子宫颈癌而与另两位法国科学家分享 2008 年度诺贝尔生理学/医学奖。

人乳头状瘤病毒是一种最小的 DNA（脱氧核糖核酸）病毒，主要感染上皮细胞，人是唯一宿主，现已确定的 HPV 型别有 110 余种。依据 HPV 型别与宫颈癌发生的危险性高低可将 HPV 分为高危型和低危型两类。低危型 HPV 如 HPV6、11、42、43、44 等，常引起外生殖器疣等良性病变；高危型 HPV 如 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68 型等，则与宫颈癌及宫颈上皮内瘤变（CIN）有关，其中以 HPV16、18 型与宫颈癌的关系最为密切。

尽管 HPV 与宫颈癌的关系已被广泛认同，令科学家们困惑的却是几乎所有的宫颈癌中均发现了 HPV 病毒的癌蛋白表达，但却不是每一个感染高危型 HPV 的患者均发生了宫颈癌。相反，在感染了 HPV 病毒的人群中，大多数患者可自愈或逆转，仅有少数患者表现为持续感染。那么，是什么机制导致了以上现象呢？究竟何种类型的 HPV 感染才需要定期随访和严密监测呢？这些问题目前尚不得而知，但面对感染 HPV 后可能发展为宫颈癌的风险，人们不得不选择大面积的筛查与频繁的随访，既造成了人力资源与物质资源的浪费，也为许多非进展性的 HPV 感染患者带来了极大的心理压力。

1. 病毒癌基因的表达

HPV 是一种具有种属特异性的嗜上皮病毒，属双链闭环的小 DNA 病毒，包含约 8000 个碱基对，其中包括 8 个早期开放读码框架（E1～E8）、2 个晚期读码框架和 1 个非编码长控区。目前有观点认为，整合后的 HPV-DNA 发生致癌作用的主要基因为 E2、E6 和 E7。在 HPV 感染的上皮细胞中环状 HPV 病毒通过 E1、E2 的开放读码框断开并线性化，插入到人体上皮细胞的染色体上，E2

ORF 的断裂可导致 E2 基因的丢失或失活，随之 E6 和（或）E7 基因表达失控，引起细胞的转化或癌变。致癌基因 E6、E7 在直接转化细胞的同时，还可与细胞周期调控蛋白相互作用，干扰正常的细胞周期调控，从而导致细胞无限制生长，引起癌变（图 1）。

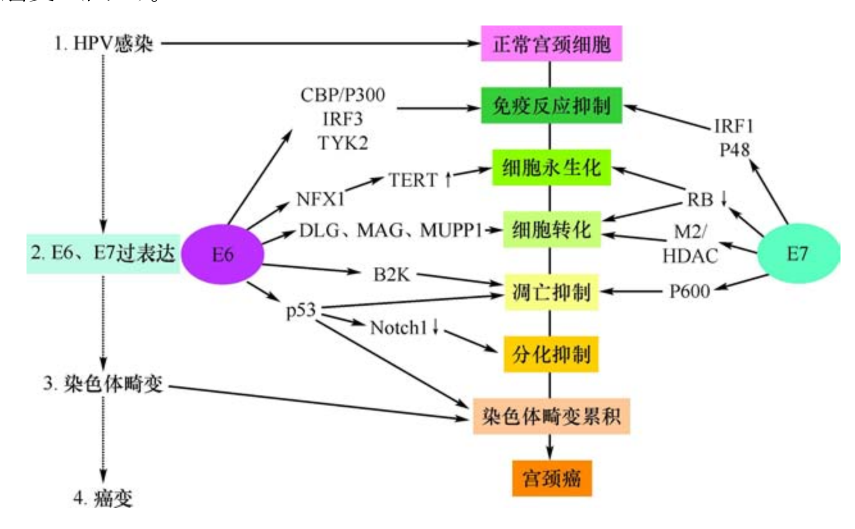


图 1　E6、E7 在宫颈癌发生发展中的协同作用模式

随着对 HPV 研究的深入，人们发现高危型 HPV 感染只是宫颈癌发生的必要因素，而非充分条件，病毒感染后所发生的一系列病毒和宿主的分子遗传学变化才是导致细胞表型发生恶性转变的主要原因。病毒癌基因的表达增强是目前公认的细胞发生恶性转变的原因之一，但除了 E2 的缺失所引起的癌基因表达失控外，有学者认为 E6、E7 的表达与病毒整合后整合位点周围宿主基因组对其表达的调控作用亦息息相关。文献报道，宫颈癌组织中常常包含一个或数个 HPV 整合位点，学者们推测这些区域高水平的 DNA 扩增会大大增强 E6、E7 癌基因的表达，从而更加有利于肿瘤的生长。这个观点已在一些包含了上百个拷贝的病毒基因组的宫颈癌细胞系中得到了验证。

2. 宿主原癌基因的激活

据报道，90% 以上的宫颈癌组织中均存在 HPV 与宿主染色体的整合体，因此，科学家们普遍认为 HPV 的致癌作用与 HPV-DNA 的整合有关，病毒整合后宿主基因组的表达变化一直是人们关注的热点。众所周知，HPV 自身具有启动子序列，可在游离状态下完成病毒的复制过程。那么，HPV 所携带的强大启动子对整合位点附近的宿主基因组有无扩增效应呢？目前，人们已在宫颈癌的组织标本和细胞系中发现了部分原癌基因的扩增，如 ras、hTERT、c-myc 等。Mako Narisawa-Saito 等还曾经将 HPV E6、E7 的癌基因与 ras、c-myc 一同导入正常

宫颈细胞中，表明在癌基因失调表达的基础上1～2个宿主基因表达的改变就可以导致宫颈癌的发生发展。

近年来，关于HPV插入诱变的理论逐渐受到研究者们的重视，但由于人体染色体序列纷繁复杂的变化性和病毒整合位点的不确定性，其宿主原癌基因的定位及作用机制尚待进一步研究。肿瘤基础研究的以上进展促使我们提出以下问题：HPV与宿主染色体整合后出现的宿主染色体重排有何意义？这是否意味着在宫颈癌中也存在类似于乳腺癌、前列腺癌等实体瘤和淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病等血液系统肿瘤中常见的由于染色体重排后出现特殊基因的激活而导致宫颈癌病变的现象呢？HPV与宿主染色体的整合位点是否为宫颈癌分子分型的标记？这是否是人们揭开HPV感染后导致宫颈癌发生的机制研究和宫颈癌的分子分型的突破口呢？

3. 问题与展望

宫颈癌与HPV感染的关系已毋庸置疑，而其具体发病机制尤其是病毒整合前后病毒与宿主基因组变化过程及其机制仍未知。尽管病毒癌基因的表达与宿主原癌基因的激活这把双刃剑在宫颈癌的发生发展中起了至关重要的作用，但究竟是何步骤在HPV诱导宫颈癌发生发展的过程中起了更为关键性的作用，尚待进一步研究。虽然目前高危型HPV的检测已作为一项宫颈癌的筛查手段被广泛开展，但单纯HPV感染并不足以导致癌变。据统计，70%的生育期妇女均有HPV感染，而宫颈癌的人群总体发病率约15/10万。大部分感染HPV病毒的妇女为一过性感染，只有极少数呈持续高负荷感染，导致宫颈病变逐步加重直至癌变。以上临床资料提示：宫颈癌只是HPV感染这一常见疾病中的偶发事件。于是，如何发掘更精确的提示癌变风险的筛查指标已经成为了妇产科学界亟须解决的问题之一。在此，我们不妨大胆设想，如能发现一种可准确预测HPV致癌潜能的生物学指标，将可更准确地预知肿瘤风险级别，为宫颈癌的筛查、随访和预后分析提供更切实的依据。

参考文献

Dall KL, Scarpini CG, Roberts I, et al. 2008. Characterization of naturally occurring HPV16 integration sites isolated from cervical keratinocytes under noncompetitive conditions. Cancer Res, 68(20): 8249～8259

Kim KY, Blatt L, Taylor MW. 2000. The effects of interferon on the expression of human papillomavirus oncogenes. J Gen Virol, 81: 695～700

Lazo PA. 1999. The molecular genetics of cervical carcinoma. British Journal of Cancer, 80(12): 2008～2018

Mako Narisawa-Saito, Yuki Yoshimatsu, Shin-ichi Ohno, et al. 2008. An multistep carcinogenesis model for human cervical cancer. Cancer Research, 68(14): 5699～5705

Mako Narisawa-Saito ,Tohru Kiyono .2007 . Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus induced carcinogenesis : roles of E6 and E7 proteins . Cancer Sci ,98 :1505～1511

Munger K , Basile JR , Duensing S ,et al . 2001 .Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein .Oncogene ,20 :7888～7898

Parkin DM .2001 . Global cancer statistics in the year 2000 .Lancet Oncol ,2 :533～543

Petry KU , Menton S , Menton M ,et al . 2003 .Inclusion of HPV testing in routine cervical cancer screening for women above 29 years in Germany : results for 8466 patients .British Journal of Cancer ,88(10):1570～1577

Pett M ,Coleman N . 2007 . Integration of high-risk human papillomavirus : a key event in cervical carcinogenesis? J Pathol ,212 :356～367

Van Tine BA , Kappes JC , Banerjee NS ,et al .2004 . Clonal selection for transcriptionally active viral oncogenes during progression to cancer .J Virol ,78 :11172～11186

撰稿人:马　丁

华中科技大学同济医学院附属同济医院

卵巢癌的早期诊断

Early Diagnosis of Epithelial Ovarian Cancer

卵巢上皮癌（又称卵巢癌）是较为常见的妇科恶性肿瘤，多见于中老年妇女，在50岁以上妇女的卵巢恶性肿瘤中约占90%。卵巢上皮癌也是死亡率最高的妇科恶性肿瘤，死亡率高达70%，其主要原因是由于卵巢位于盆腔深部，这给卵巢癌的早期诊断造成很多困难，70%的卵巢癌在临床诊断时已是晚期，严重影响了卵巢癌的治疗效果。因此，加强卵巢癌早期诊断的研究，寻找更为有效的卵巢癌早期诊断的方法和策略对降低卵巢癌患者死亡率、改善卵巢癌患者的预后有十分重要的意义。20多年来，随着影像学诊断和肿瘤标志物检测技术的发展，人们希望在人群中进行卵巢癌的筛查，以期减少卵巢癌对妇女生命的威胁，但是效果并不显著。存在的主要问题和研究难点是：①目前还没有一种十分有效的卵巢癌筛查方法；②没有建立行之有效的合理筛查计划和方案；③在人群中进行筛查费用很高，不适合中国国情。进入21世纪，许多学者开始转变研究思路，从以普通人群为筛查对象，转向筛查高危人群，从使用单一的筛查手段，到多种模式相结合，以期提高卵巢癌的早期诊断率。卵巢癌早期诊断研究的主要内容和发展趋势将集中在以下三个方面：

1. 高危人群的筛查

众所周知，遗传因素在卵巢癌的发生中具有重要意义。近来有很多研究表明，卵巢癌家族史，尤其是遗传性卵巢癌综合征（HOCS）与卵巢癌的发病有密切的关系。在妇女的一生中发生卵巢癌的危险概率约为1.4%，但是如果有一个一级亲属患有卵巢癌，那么发生卵巢癌的危险概率将增加至5%，如果有两个一级亲属患有卵巢癌，发生卵巢癌的危险概率将增加至7%，如果是遗传性卵巢癌综合征（HOCS）家族中的成员，那么发生卵巢癌的危险概率将增加至20%～59%。最近的研究还发现BRCA1基因突变与遗传性卵巢癌综合征（HOCS）有密切的相关性，BRCA1基因检测已用于卵巢癌高危人群的筛查。通过风险评估（risk assessment）、遗传咨询（genetic counseling）和BRCA基因检测（genetic testing）三个步骤来确定卵巢癌发生的高危人群，并有的放矢对高危人群进行卵巢癌筛查是提高早期诊断率最有效的方法。

2. 新的肿瘤标志物的发现及应用

目前用于诊断卵巢癌的主要肿瘤标志物是CA125，在临床症状明显的卵巢

癌患者中，85% 以上会有血清 CA125 的升高（>35U/ml），在 FIGO Ⅱ～Ⅳ期的卵巢癌患者中 90% 以上会有血清 CA125 的升高并且与分期呈相关性，但是在早期卵巢癌 CA125 升高仅占 50% 。如果将血清 CA125 作为初筛手段，一部分早期患者势必会被漏诊，对于早期卵巢癌诊断敏感性较低一直是制约 CA125 作为一线筛查手段主要的因素。近年来，新发现的一些肿瘤标志物在卵巢癌的早期诊断中显示出较好的前景期，如血浆溶血磷脂酸（plasma lysophosphatidic acid，LPA）、肿瘤相关的半乳糖转移酶、免疫反应性抑制素 C、CEA、HE4 及 CA72-4 等。新近的研究发现，CA125、HE4、CEA 和 VCAM1 多种标志物联合检测可明显提高卵巢癌的早期诊断率，敏感性为 86% ，特异性达 93% 。随着基础医学的发展和转化医学的渗入，基因组学、蛋白质组学和 microRNA 等技术不断用于卵巢癌的肿瘤标志物研究，血浆中游离 DNA 等位基因失衡和 CA125 联合检测，外周血中的游离细胞核和线粒体 DAN 水平的检测等方法用于卵巢癌的筛查和早期诊断等研究也在进行中，人们期待着能发现更为敏感、更特异的卵巢癌肿瘤标志物并用于临床。

3. 有效影像诊断技术的研发与应用

随着影像诊断技术的发展，分子影像诊断、代谢影像诊断等技术将不断用于临床。与传统的影像学诊断方法如超声、CT 和 MRI 相比，正电子发射体层显像（positron emission tomography，PET）对恶性肿瘤的诊断更为准确。PET 检查除了能显示组织器官的形态外，还能够反映组织的糖摄取和利用率，被称为“活体生化显像”。目前临床上，PET 检查是诊断复发卵巢癌最为有效的方法，但由于 PET 检查价格昂贵，目前还不能用于卵巢癌的常规检查。若能对卵巢癌高危人群和不明原因 CA125 升高的妇女进行 PET 检查，有可能会提高卵巢癌的早期诊断率。PET-CT 和 PET-MRI 联合检查前景看好，PET 显示组织代谢活性，CT/MRI 提示解剖信息，因而 PET-CT/PET-MRI 对于肿瘤鉴别和定位诊断有更加明显的优势，假阳性率和假阴性率均较低。PET-CT/PET-MRI 检查促进了临床 PET 的发展，弥补了形态学影像技术及单独使用 PET 的不足，在腹腔、盆腔恶性病变诊断中优越性更为明显。希望这些新的影像诊断技术为卵巢癌的早期诊断带来突破性进展。

参 考 文 献

丁西来，沈铿，郎景和．2003．正电子发射体层显像在诊断复发性卵巢恶性肿瘤中的价值．中华妇产科杂志，38：667～669

沈铿，郎景和．2003．卵巢上皮癌诊断和治疗中应注意的问题．中华妇产科杂志，38：65～58

ACOG Committee Opinion．2008．Number 280：The role of the generalist obstetrician-gynecologist in the early detection of ovarian cancer．Obstet Gynecol，100(Suppl 280)：1413～1416

Bristow RE,Simpkins F,Pannu HK. 2002.Positron emission tomography for detecting clinically occult surgically resectable metastatic ovarian cancer.Gynecol Oncol,85:196～200

Dimitrios H Roukos, Evangelos Briasoulis. 2007.Individualized preventive and therapeutic management of hereditary breast ovarian cancer syndrome.Nature Clinical Practice Oncology,10: vol 4 No.10

Lynch HT, Snyder CL, Lynch JF,et al. 2003.Hereditary breast-ovarian cancer at the bedside: role of the medical oncologist.J Clin Oncol,21:740～753

McLaughlin JR, Risch HA, Lubinski J,et al. 2007.Reproductive risk factors for ovarian cancer in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations: a case-control study.Lancet Oncol,8:26～34

Zoya Yurkovebtsky, Steven Skates,Alekey Lomakin,et al. 2010.Development of a multimarker assay for early detection of ovarian cancer. JCO,28(13):2159～2167

撰稿人:沈　铿

北京协和医院

肾脏疾病蛋白尿的发生机制

Pathogenesis of Proteinuria in Renal Diseases

蛋白尿是儿童肾脏疾病最常见的症状之一，可见于原发性肾病综合征、IgA肾病、先天性肾病综合征、家族性局灶节段性肾小球硬化及多种继发性肾脏疾病。目前国内外研究均已证实蛋白尿是肾脏疾病向肾衰竭进展的独立危险因素。因此，控制尿蛋白、防止肾脏病进展是重要的临床问题，而探讨蛋白尿发生、发展的分子机制及探索可能的治疗靶点一直是该领域国内外研究的热点。

早在40年前就已经认识到由肾小球足细胞（podocyte）足突（foot process）构成的裂孔隔膜（slit diaphragm，SD）结构和功能的异常是发生蛋白尿的主要和重要原因之一。足细胞即肾小球脏层上皮细胞，正常形态呈“章鱼样”，包括胞体及从胞体伸出的主足突和次级足突，肾小球中相邻足细胞的足突彼此交叉形成裂孔隔膜。应用电子显微镜可以观察到大量蛋白尿的患者或动物模型肾小球足细胞的足突消失（effacement），甚至发生融合（fusion）。但迟至20世纪90年代末才通过对一些遗传性或先天性肾病综合征的研究先后确定了多个位于裂孔隔膜的蛋白质分子，才认识了一些组成裂孔隔膜的分子。如通过对单基因遗传病芬兰型先天性肾病综合征（编码nephrin的基因NPHS1突变）、常染色体隐性遗传型家族性激素耐药型肾病综合征（编码podocin的基因NPHS2突变）、常染色体显性遗传型家族性激素耐药型肾病综合征（编码α-actinin-4的基因ACTN4突变）突变基因的确定和分析，以及对单独敲除这些基因的动物实验的研究表明，仅一个基因异常已足以导致发生大量蛋白尿、肾小球足细胞足突融合、裂孔隔膜结构消失，说明在裂孔隔膜上这些新被认识的分子对维系裂孔隔膜结构、防止蛋白尿的发生至关重要，才开始认识和了解裂孔隔膜的分子组成和分子结构，产生出“裂孔隔膜分子”及“裂孔隔膜复合体”（slit diaphragm complex）的概念，即以位于肾小球足细胞足突之间裂孔隔膜上的nephrin、podocin、CD2AP、neph1、P-cadherin和FAT等分子为核心的、相互关联的多个分子组成的复杂结构，由此加速推动了蛋白尿发生机制和防治靶点的研究进展。

TRPC6是第一个在足细胞上被确定的与蛋白尿相关的离子通道分子，TRPC6定位于裂孔隔膜，但不属于裂孔隔膜结构分子，是一个Ca^{2+}相关的通道蛋白，其基因TRPC6突变可引起常染色体显性遗传型局灶节段性肾小球硬化，并可能参与其他原因所致蛋白尿的发生。研究发现TRPC6可能是足细胞感应机

械压力变化的感受器（mechanosensor），可将胞外的机械刺激通过 G 蛋白偶联受体（GPCR）和受体酪氨酸激酶（RTK）传入胞内并激活钙离子相关信号。国内外研究均已证实 TRPC6 与裂孔隔膜分子 nephrin、podocin 和 CD2AP 存在共定位，与 nephrin 和 podocin 存在共沉淀关系。也有研究发现当以血管紧张素Ⅱ使突变 TRPC6 介导的 Ca^{2+} 内流显著增加时，足细胞内细胞骨架的排列出现异常，提示 TRPC6 不但与裂孔隔膜分子，而且与细胞骨架蛋白分子有直接关系，但是离子通道分子 TRPC6 在足细胞“重塑”中的作用，其介导的 Ca^{2+} 相关信号转导途径是否参与了足细胞“重塑”，以及分子机制尚未阐明。

足细胞骨架蛋白是足细胞的结构蛋白，是维持足细胞正常形态的分子基础。研究表明，足细胞不同部位其骨架分子的组成明显不同：胞体和主足突内主要含有微管（microtubule）和中等纤维（intermediate filament），其中微管主要以微管蛋白（α/β-tubulin）异源二聚体为基本元件构成，中等纤维由杆状蛋白如波形蛋白（vimentin）和结蛋白（desmin）等装配而成，而一些微管结合蛋白（MAPs）使微管相互交联形成束状结构以提高微管的稳定性；足突内的细胞骨架成分主要包括微丝，又称肌动蛋白纤维（actin filament，F-actin）和微丝结合蛋白如 α-辅肌动蛋白（α-actinin-4）和 synaptopodin 等。其中微丝为最主要的足细胞骨架结构蛋白，它与微管和中等纤维及其相关结合蛋白相互交联而形成排列有序的应力纤维和网架结构，以维持足细胞和足突的高度动态结构及其“可塑性”，抵抗来自尿囊腔和肾小球毛细血管的压力变化。而微丝结合蛋白如 α-actinin-4 能调节 F-actin 的聚集和解聚，从而改变足细胞的骨架结构和足细胞的可塑性。可见足细胞骨架分子，包括微丝蛋白 F-actin 和微丝结合蛋白对维持足细胞及其足突的正常形态起关键作用。但是迄今并不清楚足细胞骨架蛋白及裂孔隔膜分子是如何参与足细胞“重塑”，以及可能涉及其中的分子路径和分子机制。

目前已有许多临床研究或体内外实验的研究工作证实上述足细胞以及足突上表达分布的分子对维系正常的裂孔隔膜结构和肾小球的滤过屏障功能至关重要。虽然近年来越来越多的研究已经明确显示足细胞表达的多类分子肯定是肾脏疾病蛋白尿发生的关键分子，也已经在发生机制方面开始揭开分子间相互作用及作用通路的“面纱”，但是同时诸多研究结果也更显现了足细胞相关的分子间的作用极其复杂，是一个复杂的分子网络，欲真正理清全部的分子网络并阐明分子网络中的分子作用路线，还需要长期的深入探讨。解开这个谜团，必将为针对足细胞分子靶点防治蛋白尿打开一扇窗。

参考文献

Boute N, Gribouval O, Roselli S, et al. 2000. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephritic syndrome. Nat Genet, 24:

349～354

Faul C, Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, et al. 2007. Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. Trends Cell Biol, 17(9): 428～437

Huber TB, Schermer B, M ller RU, et al. 2006. Podocin and MEC-2 bind cholesterol to regulate the activity of associated ion channels. Proc Natl Acad Sci USA, 103: 17079～17086

Kaplan JM, Kim SH, North KN, et al. 2000. Mutations in ACTN4, encoding α-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. Nat Genet, 24: 251～256

Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, et al. 1998. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein nephrin is mutated in congenital nephrotic syndrome. J Mol Cell, 1: 575～582

Mukerji N, Damodaran TV, Winn MP. 2007. TRPC6 and FSGS: the latest TRP channelopathy. Biochim Biophys Acta, 1772: 859～868

Reiser J, Von Gersdorff G, Simons M, et al. 2002. Novel concepts in understanding and management of glomerular proteinuria. Nephrol Dial Transplant, 17(6): 951～955

Ronco P. 2007. Proteinuria: is it all in the foot? J Clin Invest, 117: 2079～2082

Singh I, Knezevic N, Ahmmed GU, et al. 2007. Galphaq-TRPC6-mediated Ca^{2+} entry induces RhoA activation and resultant endothelial cell shape change in response to thrombin. J Biol Chem, 282: 7833～7843

Weins A, Schlondorff JS, Nakamura F, et al. 2007. Disease-associated mutant alpha-actinin-4 reveals a mechanism for regulating its F-actin-binding affinity. Proc Natl Acad Sci USA, 104: 16080～16085

撰稿人：丁　洁
北京大学第一医院

儿童急性淋巴细胞白血病复发的机制及预警

Mechanism and Early-Warning of Relapse in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia

近年来，儿童急性淋巴细胞白血病（acute lymphoblastic leukemia，ALL）的疗效有了很大提高，5 年无事件生存率超过 80%。但仍有约 15% 的患儿复发，其中 2/3 左右出现骨髓复发，约 1/4 出现中枢神经系统复发，其余为睾丸复发。这已成为儿童 ALL 疗效进一步提高的主要障碍。

目前采用的形态学-免疫学-细胞遗传学-分子生物学（MICM）分型结合微小残留病（minimal residual disease，MRD）评估复发危险度，虽然能够预测大部分患儿的预后，但仍有部分中危甚至低危的患儿出现复发。复发患儿的预后很差，采用目前的化疗药物很难治愈。因此，临床医生迫切需要了解，复发是什么原因造成的？如何完善复发危险度分型？如何更准确地评估预后？这些问题的解决，一方面有助于尽早识别那些注定要复发的患儿，从而采用适当强度的治疗方案，避免复发，即将其消灭在萌芽状态；另一方面，将极大地推动更有针对性的新药开发，这也是克服复发的最终与根本途径。

免疫球蛋白/T 细胞受体（immunoglobulin/T cell receptor，Ig/TCR）基因重排是目前公认的 ALL 细胞的克隆性标志。通过比较初诊和复发时的重排序列，过去认为，除只占 0.5%～1.5% 的第二白血病以外，临床复发的机制可分为两种：①初诊时的白血病细胞克隆未被有效清除造成复发，表现为初诊和复发时的 Ig/TCR 基因重排完全相同；②克隆演化，复发时经常出现新的重排，或初诊时的部分重排在复发时消失，这种现象称为克隆演化，可能是由于初诊时的白血病细胞克隆在治疗过程中受内外环境因素的影响，获得了新的遗传学改变，产生继发性药物耐受，导致白血病复发。

然而，近些年的研究指出，还存在另外一种重要的复发机制——克隆选择，即复发来源于初诊时就已经存在的亚克隆，该亚克隆具有原发耐药性，随着治疗的进行，逐渐出现克隆扩增，最终导致复发。表现为复发时的白血病克隆在初诊时即存在，但并非优势克隆，有时甚至水平极低，必须用灵敏度很高的实时定量 PCR 技术，结合等位基因特异性寡核苷酸方法（灵敏度可达 10^{-5}～10^{-4}），才能检出。据估计，由克隆选择引起的复发占 21%～35%。而只有当复发时新出现的重排不能在初诊时检出时，才称为克隆演化。

以 Ig/TCR 基因重排为基础的克隆选择理论，得到了许多其他研究的印证。Mullighan 等发现 91.8% 的复发儿童 ALL 在初诊和复发时的 DNA 拷贝数改变（copy number alteration，CNA）存在差异，利用“DNA 缺失特异性 PCR”分析复发时新出现的 CNA，证明 80% 所分析的 CNA 在初诊时即低水平存在。复发时出现的对伊玛替尼耐药的突变型 BCR-ABL 融合基因，同样在初诊时低水平存在。因此，如图 1 所示，与克隆演化一样，克隆选择机制确实存在，二者都是复发的重要原因。

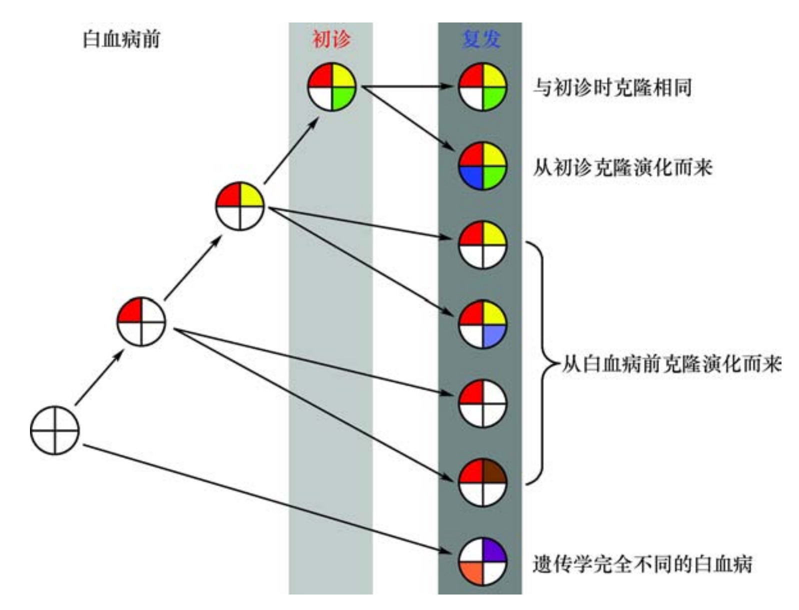


图 1 ALL 初诊与复发样本的克隆相关性

每种颜色代表一种遗传学改变

克隆选择理论的建立是 ALL 复发机制研究的一项重要突破，而且为今后的研究提供了重要线索。下一步需要解决的是，这些变异是通过什么样的方式，经过哪些生物学通路，最终导致复发。

过去直观地认为复发是由于白血病细胞具有耐药性。许多参与药物代谢及耐药的基因，其功能、调控机制、临床应用价值等曾经是白血病复发研究的热点。然而，近几年的基因表达谱研究结果显示，这些药物学和药物遗传学研究中的经典基因，在复发时并未出现低表达或过表达。因此，目前认为耐药相关基因的异常虽然与早期复发有一定关系，但并不是主要原因。

通过将同一患儿的初诊与复发白血病细胞的基因表达谱进行对比，发现早期复发（发生在治疗开始后 36 个月以内）时，参与细胞周期调控、DNA 修复和凋亡的基因往往存在异常表达，但未发现与晚期复发（发生在治疗开始后 36 个月以

上）有关的共同生物学通路。上述结果有力地说明了细胞周期、DNA 损伤修复、凋亡等生物学通路的异常与早期复发密切相关，应该成为今后关注的重点之一。

microRNA 作为一种非编码小 RNA，可以在转录和翻译水平调控靶基因 mRNA 的表达，在白血病研究中日益受到重视。有证据显示，某些特定的 microRNA表达异常可能与早期骨髓复发有关，包括 miR-7、miR-216、miR-100 的上调，miR-486、miR-191、miR-150、miR-487、miR-342 的下调。而另一些则可能与中枢神经系统复发有关，如 miR-7、miR-198、miR-633 的上调，miR-126、miR-345、miR-222、miR-551a 的下调等。

除白血病细胞自身因素外，宿主的遗传背景也可能在复发中发挥重要作用。例如，Yang 等发现 102 个单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism，SNP）位点与诱导缓解治疗结束时的 MRD 有关，其中 21 个与复发相关，另外 21 个 SNP 则通过影响化疗药物的体内代谢，增加药物暴露，促进白血病细胞的清除。

近来骨髓微环境对治疗反应的影响逐渐引起注意。ALL 细胞依赖外源性门冬酰胺维持生存，因此左旋门冬酰胺酶成为治疗 ALL 的主要药物之一。研究显示，骨髓间充质细胞高表达门冬酰胺合成酶，分泌大量门冬酰胺进入骨髓微环境，从而对 ALL 细胞产生保护作用，使其对抗左旋门冬酰胺酶而存活。这被认为是一种新的耐药机制，可能与复发有关。

上述只是 ALL 复发研究中的几个热点。从中已可看出，复发不是少数几个基因的异常引起的，而是多个基因、多条通路、多种因素相互作用、共同造成的。这为复发机制的阐明设置了层层障碍。同时，很难在复发时获得数量多、比例高的白血病细胞用于研究，是实际工作中经常遇到的问题，而且复发时的 ALL 细胞经历了强烈化疗，此时表现出的各种特点能否代表“启动”复发的原因，也是值得认真思考的。

正是由于复发机制的复杂性，目前除 MRD 外，还没有其他新的预后预测指标，或复发预警指标得到广泛承认与应用。虽然与 MRD 或复发相关的分子标志不断出现，但都需要大样本、长期追踪的验证，例如参与 B 细胞发育 IKZF1 基因，与凋亡、组蛋白基因转录后加工、细胞周期有关的 CASP8AP2 基因等，都值得关注。

参考文献

Bhojwani D，Kang H，Moskowitz NP，et al. 2006. Biologic pathways associated with relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia：a children's oncology group study. Blood，108(2)：711～717

Choi S，Henderson MJ，Kwan E，et al. 2007. Relapse in children with acute lymphoblastic leu-

kemia involving selection of a preexisting drug-resistant subclone. Blood, 10(2): 632～639

Flotho C, Coustan-Smith E, Pei D, et al. 2006. Genes contributing to minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: prognostic significance of CASP8AP2. Blood, 108(3): 1050～1057

Iwamoto S, Mihara K, Downing JR, et al. 2007. Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. J Clin Invest, 117(4): 1049～1057

Mullighan CG, Phillips LA, Su X, et al. 2008. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. Science, 322(5906): 1377～1380

Mullighan CG, Su X, Zhang J, et al. 2009. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med, 360(5): 470～480

Pfeifer H, Wassmann B, Pavlova A, et al. 2007. Kinase domain mutations of BCR-ABL frequently precede imatinib-based therapy and give rise to relapse in patients with de novo Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ ALL). Blood, 110(2): 727～734

Yang JJ, Cheng C, Yang W, et al. 2009. Genome-wide interrogation of germline genetic variation associated with treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. JAMA, 301(4): 393～403

Zhang H, Luo XQ, Zhang P, et al. 2009. MicroRNA patterns associated with clinical prognostic parameters and CNS relapse prediction in pediatric acute leukemia. PLoS ONE, 4(11): e7826

撰稿人:吴敏媛　李志刚

首都医科大学附属北京儿童医院

异常宫内环境烙下了代谢综合征的“印记”

Has the Imprint of Metabolic Syndrome Been Stamped by Abnormal Intrauterine Environment

代谢综合征（metabolic syndrome，MS）是中心性肥胖、胰岛素抵抗、糖耐量损伤、血脂紊乱、非酒精性脂肪肝病和高血压等多种疾病的综合，是心脑血管疾病、糖尿病等重大非传染性疾病的早期病变。城市中老年人群中MS发病率高达50%以上，所以一度被认为是成人期疾病，最近MS在儿童和青少年中的发病率呈较快上升趋势，需引起社会的高度关注。

近来已经在不同国家、不同种族人群中证实了低出生体重或宫内生长迟缓与MS之间的相关性。英国研究者发现随着出生时体重下降，缺血性心脏病或2型糖尿病的发生率增加。对瑞典Uppsala男性随访20余年也有类似结果，并发现出生时宫内发育迟缓或消瘦而成年后肥胖者危险性更高。美国Pima Indian人群中胰岛素抵抗或2型糖尿病的发生与出生体重呈“U”形关系（即出生体重极高和极低者都易出现糖耐量损害）。米杰等也报道中国人随着出生体重的降低，成人期冠心病、高血压等风险率显著升高。

出生体重（质量）是衡量胚胎和（或）胎儿生长发育的宫内环境的重要参数。低出生体重与MS相关性的内在机制是什么？或者说，不良宫内环境对胎儿个体“烙下何种印记”？使得带有这种“烙印”的群体被笼罩在MS、心脑血管疾病和2型糖尿病的阴影之下！研究者一直试图揭开谜团。1989年，Barker等首先提出“成人疾病的胎儿起源假说”（fetal origin of adult disease），其核心为：胎儿为适应宫内营养不良的环境，其自身代谢和器官组织结构将发生适应性调节，导致心血管、胰腺和肝脏等代谢结构发生永久性改变，这种变化可能是成人期发生冠心病、糖尿病和高血压等疾病的根源。1991年，Lucas等提出了“营养程序化”（nutritional programming）的概念，即在发育关键或敏感时期的营养刺激或损害将对机体或生理系统功能的程序化设定，使组织细胞数量或比例永久性地得到改变，使2型糖尿病等易患性增加。Ozanne SE则于2001年进一步提出了“代谢程序化”（metabolic programming）。程序化理论奠定了“成年疾病胎儿起源机制”的核心。2002年，Barker等则认为“发育可塑性”可能比“程序化”更适用于成人疾病发育起源的研究。2004年，Bateson P则指出，除宫内营养剥夺外，胎儿对一系列产前环境的适应性反应该有更广阔的、进化性的内容。

在上述基础上，近年来正式提出“健康与疾病的发育起源”（developmental origins of health and disease，DoHaD）学说：人类在发育早期（胎儿、婴儿、儿童期等）经历的不利因素，将会影响成人糖尿病、心血管疾病、肿瘤、神经精神等疾病的发生，从而把早期发育的关键时期从子宫内（胚胎期）延伸到子宫外，疾病范围从糖尿病、心血管等代谢综合征相关性疾病拓展到肿瘤、神经、精神性疾病等领域，而影响因素则从单纯营养不良扩大到其他不良刺激甚至行为和精神因素。

在病理生理水平上，早期环境影响成人期健康可能是通过某些共同机制实现的，如影响下丘脑-垂体-肾上腺轴的结构和功能，使食欲、能量代谢等发生异常；或诱导氧化应激反应，氧化与抗氧化平衡失调，引起组织细胞损伤。但不同系统的疾病发生的病理生理过程还有待明确。通常情况下，对出生时营养不良或体重过低的孩子，都建议其增加营养，以实现快速生长或追赶生长。若考虑到上述机制和因素，则为喂养低出生体重的孩子出了难题：在出生后是给予“丰富营养”、“常规营养”，还是应该考虑宫内早期预设的“程序”或“烙印”继续模拟宫内的营养状态呢？

表观遗传学（epigenetics）被定义为“在基因组序列不变的情况下，决定基因表达与否并可稳定遗传下去的调控密码”。这些密码包括 DNA“后天性”修饰如 DNA 甲基化修饰、组蛋白修饰、ATP 依赖的染色质修饰等，RNA 编辑和非编码 RNA 等，表观遗传机制也在基因和表型调控中起作用。与经典遗传学相比，表观遗传学主要研究“表观遗传密码”建立和维持的机制，以及其如何决定细胞的表型和个体的发育。表观遗传密码构成了基因（DNA 序列）和表型（由基因表达谱式和环境因素所决定）间的关键信息界面，它拓展了经典遗传密码中所隐藏的信息。

胚胎（胎儿）发育是遗传信息和环境因素相互作用而产生特异表型的编程过程，表观遗传修饰可能“记录”围生期的刺激，研究胚胎（胎儿）发育编程中表观遗传调控，对于阐明成人疾病“胎儿起源”的机制有着重要意义。宫内生长迟缓、孕期糖尿病和先兆子痫等模型中都发现相关基因存在表观遗传修饰；心血管发育也受表观程序化影响，其候选基因易于被印记化；而对 2 型糖尿病相关基因的表观遗传学调控可能是控制宫内生长迟缓者发展为 2 型糖尿病的途径之一。

研究发现，宫内发育迟缓的子代大鼠多处器官出现了表观遗传修饰改变，如肝脏基因组 DNA 甲基化持续降低，组蛋白乙酰化水平提高；肾脏 p53 启动子甲基化程度明显降低，使 p53 基因表达量增加，使肾小球数量减少；胰岛 B 细胞中甲基化 CpG 结合蛋白 2 与胰腺十二指肠同源框蛋白 1（pancreatic and duodenal homeobox factor 1，Pdx1）基因启动子区结合，抑制 Pdx1 表达，使胰腺发育不全，增加了 2 型糖尿病的易感性；脑内海马及室周白质内组蛋白乙酰化水平

特异性改变可能诱发神经内分泌重编程，使个体表型异常。母亲围生期行为对新生儿神经系统发育的影响也与表观遗传修饰密切相关：大鼠产后1周内对子代的呵护行为（如舔弄、理毛与弓背照抚）可增加海马糖皮质激素受体（glucocorticoid receptor，GR）的去甲基化，使子代海马GR高表达、不易恐惧，应激反应适度。但对其他表观遗传变异和调控还知之甚少。表观遗传修饰如甲基化能记录早期病理生理和营养、心理行为等环境的变化和刺激，从而导致疾病的出现。由此假设，后期特定的良性环境刺激是否能“修正”或“消除”某些不利的甲基化改变，从而把处于代谢综合征危险边缘的人们引向健康的坦途？

DOHaD学说为糖尿病、心脑血管等成人期多发病的早期预防、治疗开启了新窗口，不良的宫内和出生后环境在生命早期对MS的发生发展进行了“程序化设定”，但目前该领域中还有很多方面亟待明确：影响发育早期的不利因素如何界定；不同疾病的病理生理过程如何演变；如何建立发育早期合适的过营养模型模拟现在过营养的饮食环境；表观遗传机制中如不同时期不利环境中的DNA甲基化谱变异、染色质重塑的机制等研究刚刚起步；RNA编辑和非编码RNA在胎儿程序化中的机制几近空白；除表观遗传机制外，是否有其他的机制参与DOHaD过程等都有待于深入研究……随着各学科发展，生命早期的健康调控将成为可能，代谢综合征等疾病的早期预防也有望实现。

参考文献

米杰,Law CM.1999.北京市41～47岁人群出生时发育指标与成年期糖耐量减低的关系.中华预防医学杂志,33(4):209～213

王秀敏,梁黎,杜立中.2005.出生体重与儿童期胰岛素抵抗关系的研究进展.国外医学·儿科学分册,32(5):311～313

Barker DJ,Osmond C,Law CM. 1989. The intrauterine and early postnatal origins of cardiovascular disease and chronic bronchitis.J Epidemiol Community Health,43(3):237～240

Barker DJ,Osmond C.1986. Infant mortality, childhood nutrition,and ischaemic heart disease in England and Wales. Lancet,21:1077～1081

Barker DJ.2004.Developmental origins of adult health and disease. J Epidemiol Community Health,58(2):114～115

Holness MJ,Sugden MC. 2006.Epigenetic regulation of metabolism in children born small for gestational age. Curr Opin Clin Nutr Metab Care,9(4):482～488

Lucas A.1991.Programming by early nutrition in man. Ciba Found Symp,156:38～50

McGowan PO, Meaney MJ, Szyf M.2008. Diet and the epigenetic (re)programming of phenotypic differences in behavior.Brain Res,1237:12～24

Park JH, Stoffers DA, Nicholls RD,et al. 2008.Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx 1. J

Clin Invest,118(6):2316～2324

Zethelius B, Hales CN, Lithell Ho, et al. 2004. Insulin resistance, impaired early insulin response, and insulin propeptides as predictors of the development of type 2 diabetes: a population-based, 7-year follow-up study in 70-year-old men. Diabetes Care,27(6):1433～1438

撰稿人:赵正言　王秀敏
浙江大学医学院附属儿童医院

遗传代谢病的新生儿筛查和诊断

Newborn Screening and Diagnosis for Inborn Errors of Metabolism

遗传代谢病是由于遗传代谢途径的缺陷引起异常代谢物的蓄积或重要生理活性物质的缺乏而导致相应临床症状的疾病。它涉及氨基酸、有机酸、脂肪酸、尿素循环、糖类、类固醇、金属、维生素等多种物质的代谢异常，可导致全身多个系统受损。此类疾病种类繁多，目前已发现 600 余种，是人类疾病中种类最多的一类疾病。虽然单一病种发病率低，但总体发病率高。我国每年约 2000 万的出生人口中，有 40 万～50 万名儿童患有遗传相关性疾病。患儿在新生儿时期常没有特殊的临床表现，多数患儿在确诊和治疗之前即已死亡，或因贻误治疗时机造成神经系统不可逆损伤，即使存活也需终身医疗保健服务。因此，遗传代谢病是导致夭折或残疾的主要病因之一，对人口素质、家庭乃至社会的发展构成很大的威胁。如能在出生后及早诊断，可通过早期治疗，降低患儿的病死率及后遗症发生率，故在全国范围内开展新生儿期常见遗传代谢病筛查工作至关重要。

我国新生儿遗传代谢病筛查工作起步于 20 世纪 80 年代初，从自发开展研究到有序而又有组织地实施，取得了长足进步。但由于我国地域广阔，人口众多，经济发展落后地区筛查情况不理想，部分地区至今尚未启动新生儿筛查。全国新生儿筛查率仅约 50%，而针对遗传代谢病的特异性诊断则更少。目前全国广泛开展的遗传代谢病筛查主要包括先天性甲低和苯丙酮尿症，而近年发展的串联质谱分析技术（tandem mass spectrometry，MS/MS）一次能筛查出氨基酸代谢异常、脂肪酸代谢异常及有机酸血症等 30 余种常见遗传代谢病，实现了从一种实验检测一种疾病到一种实验检测多种疾病的根本转变，是一种具备高灵敏性、高特异性、高选择性及高通量快速检测的技术，可以更有效、更早地发现遗传性代谢疾病。但是，由于仪器昂贵、技术要求高等问题，我国目前仅有少数新生儿疾病筛查中心应用 MS/MS 开展新生儿疾病群体筛查或用于高危儿的筛查，但今后这项技术必将逐步在全国开展，使新生儿筛查水平提升到一个新的层次；而在筛查的同时，如何进行遗传代谢病家系的收集和注册管理无疑是使我们更好地认识和管理遗传代谢病急需开展的工作；另外，由于遗传代谢病的特殊性，很多临床医师不了解此类疾病，常发生误诊或漏诊，故加强广大临床医师对此类疾病的认识也是开展新生儿常见遗传代谢病筛查的基础。

遗传代谢病早期筛查十分重要，但即使进行了筛查，仍然存在着假阴性和假

阳性。假阴性可能与筛查时间过早、药物干扰、标本采集和运输等有关，假阳性可能与设定的临界值偏低等有关。最终确诊仍需依靠细胞遗传学、生化遗传学和分子遗传学检查等。①细胞遗传学检查：染色体核型分析是较早应用于遗传病诊断的辅助手段。目前使用的检测染色体畸变技术包括高分辨率显带技术、荧光原位杂交（FISH）技术、SKY 技术（用不同的标记物配比标记不同的染色体）和微阵列-比较基因组杂交（array-CGH）等。②生化遗传学：是遗传病诊断中的重要辅助手段。临床上常用的检测方法包括尿有机酸分析和血、尿氨基酸分析，以及血酰基肉碱分析和长链脂肪酸分析等。我国武汉、北京、上海于 20 世纪末率先引进气相质谱色谱（GC-MS）技术诊断有机酸代谢障碍疾病。此后，其他城市也相继开展，各地阳性检出率为 8.26% ～10.40% 。而高压液相分析仪（HPLC）则可通过检测血尿中的氨基酸含量诊断氨基酸代谢病，串联质谱用于测定血滤纸片标本中酰基肉碱和氨基酸。除此之外，某些遗传代谢病的确诊如溶酶体病、糖原累积病等需酶学检测确诊，临床上已逐步开展。③分子遗传学：随着分子遗传学技术的发展，SNP 纳米金探针凝集分析技术和微阵列以及全基因组扫描（genome-wide scan，GWS）等各种新技术成为重要的诊断手段，虽然目前临床尚未普及，但是发展高通量、快速、高性价、自动化的临床应用遗传分析技术将是发展趋势。然而，基因分析仅能对高度怀疑的基因突变进行检测，对未知致病基因的遗传代谢病很难诊断；而且多数遗传代谢病难以建立基因型和表型的对应关系，故以上三类诊断方法各有利弊、互为补充，需综合运用。

尽管在新生儿遗传代谢病筛查和诊断上取得了一定的进步，但仍面临一系列挑战。首先，遗传代谢病的疾病谱正在迅速扩大。除了发现新的疾病种类外，对已知疾病变异型的理解也进一步加深了对遗传性代谢病的认识。此外，一些曾被认为不属于遗传代谢病的疾病，可能由于科学的进步从而发现某种与该病密切相关的特异性酶、受体或转运蛋白缺陷等而需重新归类。其次，临床诊断水平有待提高。近年来，分子遗传学在疾病诊断中的应用显得尤为重要，特别是对家系中隐性突变基因的检测，是目前遗传代谢病诊断的重要进展之一，然而对分子遗传学检测结果的解释必须慎之又慎。另外，应用串联质谱技术为新生儿期遗传代谢病的筛查带来了革命性的进展。虽然该技术非常敏感，但仪器设备昂贵，掌握仪器的技术要求较高，结果的解释也较复杂，而且串联质谱技术目前一次也只能筛查出 30 余种常见遗传代谢病，如何进一步扩大筛查的遗传代谢病种类，如何找到更好的指标和更经济有效的方法进行筛查都是我们今后努力的方向。最后，尽管基因治疗被认为是治疗遗传代谢病最有效的方法，但其应用前景迄今仍不明确，故目前大部分遗传代谢病即使明确诊断，仍得不到针对病因的治疗，这又进一步阻碍了遗传代谢病筛查工作的开展，如何让这类“不治之病”全部成为“可治之病”也是我们面临的难题。除此之外，由于目前科学发展的水平有限，大多

数遗传代谢病无法开展产前诊断，这更强调了早期进行遗传代谢病新生儿筛查和诊断的重要性。如果能解决上述难题，将会使我们在攻克遗传代谢病的医学道路上前进一大步，这还需要广大儿科临床医师、遗传代谢专科医师、实验室技术人员及政府相关部门等的共同不懈努力。

参考文献

罗小平，王慕逖，魏虹．2003．尿滤纸片法气相色谱-质谱分析技术在遗传性代谢病高危筛查诊断中的应用．中华儿科杂志，41(4)：245～248

Botkin JR，Clayton EW，Fost NC，et al．2006．Newborn screening technology：proceed with caution．Pediatrics，117(5)：1793～1799

Botkin JR．2005．Research for newborn screening：developing a national framework．Pediatrics，116(4)：862～871

Hanley WB．2007．False-positive results in expanded newborn screenin．Pediatrics，119(2)：414～415

Hiraki S，Green NS．2010．Newborn screening for treatable genetic conditions：past，present and future．Obstet Gynecol Clin North Am，37(1)：11～21

Norman R，Haas M，Chaplin M，et al．2009．Economic evaluation of tandem mass spectrometry newborn screening in Australia pediatrics，123(2)：451～457

Waisbren SE．2008．Expanded newborn screening：information and resources for the family physician．Am Fam Physician，77(7)：987～994

撰稿人：罗小平　吴　薇

华中科技大学同济医学院附属同济医院

癫痫的发生机制

Pathogenesis of Epilepsy

癫痫是以表现各异的痫性发作为特征的慢性脑功能障碍综合征。由于其病因的多样性、临床发作的特殊性和不可预测性，以及疾病结局和病人对治疗反应的复杂性，癫痫一直带有浓厚的神秘色彩，为社会大众所畏惧。痫性发作（seizure）一词来源于古希腊语，有“被（神灵）控制”之意。许多民族历史上将癫痫患者视为“神鬼附体”。直到 1924 年德国精神病学家 Berger 医生首次记录到人体脑电活动之后，癫痫异常放电的本质才逐渐得到科学的揭示。近百年来人类在癫痫临床、脑电特点和治疗方面取得了诸多进展。近二十年来神经科学、分子遗传学、神经影像学和临床治疗技术的飞速发展，为癫痫的临床诊治、病因学和遗传学研究带来许多突破性成果，但癫痫的病因和确切发病机制迄今未明。

神经系统通过复杂的兴奋-抑制反馈机制，维持神经细胞膜的稳定性。癫痫的发生被认为是神经元兴奋活动和抑制过程的失衡所致。研究表明，癫痫的发生具有相应的组织病理学基础。尽管癫痫的病因复杂，致痫灶分布也各不相同，但其异常放电大多通过相同的脑结构扩布，主要包括边缘系统和脑干网状结构。动物实验及难治性癫痫术后病理研究证实，致痫灶内存在抑制性神经元减少、锥体细胞抑制性突触减少和星形胶质细胞增多等改变。在癫痫病灶的周围，神经元的膜电位与正常神经元有所不同，在每次动作电位发生之后出现阵发性去极化偏移，并产生高幅高频的棘波放电。异常放电局限于大脑皮质的某一区域时，表现为部分局灶性发作。异常放电起始于中央脑（丘脑和上部脑干）并仅累及脑干网状结构上行激活系统时，则表现为失神发作；而广泛投射至两侧大脑皮质则表现为全身强直-阵挛性发作。随着发作的开始，癫痫灶内巨大突触后电位，通过负反馈的作用而激活抑制机制，促使发作放电的终止。同时癫痫发作所引起的代谢产物堆积，以及神经胶质细胞对兴奋性神经介质的清除等过程，也是发作终止的重要因素。若上述终止因素失衡，异常放电在反馈回路不能自行停止，则导致癫痫持续状态。

影响异常放电的因素很多，涉及生物化学、遗传学、形态学、免疫学等学科诸多环节因素。其中生物化学和分子生物学几十年来一直是研究的热点。目前把脑内氨基酸类神经递质分为兴奋和抑制性两大类，主要的抑制性氨基酸神经递质有γ-氨基丁酸（GABA）、甘氨酸（Gly）和牛磺酸（Tau）。GABA 在大脑皮质、

海马、丘脑、基底节和小脑中起重要作用，Gly对脊髓和脑干的功能有明显的抑制性作用影响，Tau对脑的抑制过程也可能有一定影响。现在已经清楚：抑制性和兴奋性氨基酸类神经递质活性之间的平衡对正常的神经生理功能非常重要，并可能在癫痫的病理形成机制和治疗理论中扮演关键角色。基于在对经典神经递质乙酰胆碱（ACh）、去甲肾上腺素（NE）、多巴胺（DA）、5-羟色胺（5-HT）及其受体，以及钙离子、自由基、一氧化氮等多种因素在癫痫发病中的作用机制进行了大量研究，近40年来发现了不少具有生物活性的肽类物质也参与神经信息传递，该类物质称为神经肽。神经肽在脑功能活动中的重要性日益受到关注。许多神经科学家认为，除了经典递质之外，广泛分布于神经系统内的神经肽也是神经递质和调质，神经肽与癫痫发作密切相关。

免疫、神经、内分泌三大系统及其相互影响在癫痫发病过程中发挥重要作用。也可以说，癫痫的发病与免疫-神经-内分泌网络的功能失衡密切相关。随着现代免疫学技术的迅速发展，国内外已用多种免疫技术成功地制作实验性癫痫动物模型，同时在临床研究中亦证实一些癫痫患者在治疗前后确实存在多种免疫异常。研究发现，癫痫动物和病人的脑脊液和脑组织中存在多种免疫细胞因子改变，例如TNF（肿瘤坏死因子）-α和白介素-6含量增高、外周血中的抗脑抗体增高等；癫痫发作时，大脑海马和皮质中可抑制癫痫发作的一种内分泌激素糖皮质激素受体减少。白细胞介素-2、雌激素受体、代谢型谷氨酸受体等免疫、内分泌、神经物质都可共存于神经细胞；免疫细胞因子可通过受体和信使干预神经细胞内的转导过程而参与癫痫发病机制，内分泌激素通过其胞质或核受体对神经细胞进行转录干扰，影响基因表达，进而控制蛋白质合成而参与癫痫的发病过程机制，内分泌激素也可通过对免疫功能的调节参与癫痫的发病机制。

遗传是癫痫发病的主要原因之一，针对基因及其功能的研究可能成为癫痫发病机制探索的突破点。迄今已明确人类癫痫相关基因数十种，但同时也发现了越来越多的新问题，特别是遗传异质性问题，即同一临床表型存在多个基因位点，而同一基因型又可能存在不一致的临床表型。多个突变基因之间有何联系，不同遗传癫痫类型的基因改变如何通过某一共同途径来影响神经元的兴奋性，所发现的异常基因有何治疗和预防价值，还都未能最终解决。目前普遍的观点认为，癫痫是一种具有临床表型和基因型双重异质性的疾病，绝大多数遗传相关癫痫为复杂遗传病，真正的单基因遗传性癫痫只占少数。

癫痫发病机制的研究深化了对癫痫本质的认识，也为筛选、设计抗癫痫药，研究抗癫痫药之间的相互作用提供了思路和方法。但机体内存在多种癫痫发病相关机制，多数观点只是从一个侧面对癫痫病因和发病过程的认识，不同理论之间甚至存在矛盾，还有诸多谜团待解。例如，为什么同样部位的脑病变既可以不引起癫痫，又可以引起症状迥异的癫痫发作？为什么同一家族，甚至是同卵双生的

遗传性癫痫治疗反应和预后可能相去甚远？癫痫患者脑神经元异常放电的确切机制究竟是什么？为什么癫痫患者容易共患精神行为障碍和偏头痛等其他神经精神疾病？…… 凡此种种，无不引起神经科和精神科医生及相关领域科学家的浓厚兴趣，对癫痫确切发生机制的研究因而成为该领域最为活跃的课题之一，但迄今尚难以预计何时能够根本解决这些千古难题。

参考文献

Ben-Ari Y, Gaiarsa JL, Tyzio R, et al. 2007. GABA: a pioneer transmitter thatexcites immature neurons and generates primitive oscillations. Physiol Rev, 87(4): 1215～1284

Haan J, Terwindt GM, van den Maagdenberg AM, et al. 2008. A review of the genetic relation between migraine and epilepsy. Cephalalgia, 28(2): 105～113

Haan J, van den Maagdenberg AM, Brouwer OF, et al. 2008. Migraine and epilepsy: genetically linked? Expert Rev Neurother, 8(9): 1307～1311

Hartman AL, Gasior M, Vining EP, et al. 2007. The neuropharmacology of the etogenic diet. Pediatr Neurol, 36(5): 281～292

Iftinca MC, Zamponi GW. 2009. Regulation of neuronal T-type calcium channels. Trends Harmacol Sci, 30(1): 32～40

Laschet J, Louvel J, Kurcewicz I, et al. 2008. Cellular mechanisms of the epilepsies: in vitro studies on humantissue. Neurochirurgie, 54(3): 141～147

Yang F, Liu ZR, Chen J, et al. 2010. Roles of astrocytes and microglia in seizure-induced aberrant neurogenesis in the hippocampus of adult rats. J Neurosci Res, 88(3): 519～529

撰稿人：秦　炯

北京大学第一医院

睡眠阻塞性疾病成因、发病机制及诊治研究

Etiology, Pathophysiology and Management of Obstructive Sleep Apnea

阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征（obstructive sleep apnea hypopnea syndrome，OSAHS）以睡眠时打鼾、反复呼吸暂停、白天嗜睡等为主要表现。我国成人患病率达 3.5%～4.6%。OSAHS 可造成间歇性缺氧、睡眠结构破坏、胸腔压力及交感神经活性异常升高等一系列继发病理生理改变，严重时可直接致死。已经证实 OSAHS 是心脑血管疾病（高血压、冠心病、脑血管疾病）、糖尿病等多种慢性疾病的独立危险因素。重症患者 8 年死亡率明显高于对照；积极采取有效的措施治疗 OSAHS 可以降低心脑血管疾病等慢性疾病的发病风险，以及有效控制糖尿病等代谢性疾病的发病程度。

上气道中段是由舌、软腭、咽侧后壁等软组织结构组成的管道，由于软组织缺乏骨性或软骨性结构支撑，容易出现塌陷。OSAHS 的病理生理学特征是睡眠时出现上气道反复间断性软组织塌陷，发生阻塞，导致呼吸暂停。同时，也因为大部分 OSAHS 患者存在着鼻腔、软腭等局部解剖异常，清醒时患者依赖咽部周围肌肉的主动调节，扩张咽腔，维持气道开放；睡眠时神经-气道扩张肌调控功能减弱，肌肉张力降低，咽腔发生塌陷。OSAHS 患者由于睡眠中频发间歇性低氧，也可以引起上气道扩张肌的过度疲劳，恶化气道扩张肌的代偿能力，造成疾病负荷加重。

OSAHS 患者个体差异较大，成因复杂，遗传、肥胖、上气道解剖结构异常、炎症、呼吸调节紊乱及气道神经-肌张力调节功能障碍等多种因素被认为参与了发病。除鼻腔、咽腔狭窄引起上气道堵塞外，目前尚难以确定与 OSAHS 发病有直接关联的更多的独立因素。近年来炎症、相关遗传因素及上气道神经肌肉调节失衡在成人发病机制中的作用备受关注。然而，哪些因素是 OSAHS 发病的始动及可控因素尚难以定论，成为目前研究的热点。

OSAHS 治疗受到个体病因学认识的限制，规划治疗有一定困难。睡眠持续正压通气是一种有效的保守治疗方法，问题是数量可观的患者群体不能耐受睡眠中持续带机维持功能性呼吸；上气道解剖结构异常影响正常呼吸，选用外科矫正治疗是目前无法回避的主要治疗手段。处置原则是通过矫正鼻腔解剖畸形扩大有效通气空间及保留基本结构矫正增生肥厚的软腭。代表性手术有鼻腔扩容术、H-UPPP 等。治疗的有效性取决于解剖结构异常在患者个体身上是否占有主导

地位以及进行外科干预的时机；诊断明确，适应证选择准确，早期干预可以取得令人满意的治疗效果；只有轻微解剖结构异常，睡眠时由于呼吸控制功能紊乱，上气道神经-肌张力调控功能异常等因素导致 OSAHS，或者由于睡眠时长期的间歇性呼吸暂停引发的中枢性病理损伤，导致呼吸控制功能紊乱及上气道神经-肌张力调控等功能发生了不可逆性病变。这类患者依靠手术疗效很难获得成功。

OSAHS 致病因素的复杂性和个性化治疗的差异性很大程度上影响正确判断始发致病因素，以及正确选择干预时机。由此，围绕 OSAHS 成因、发病机制和规范治疗的一系列相关问题应运而生，有待解决：①上气道解剖异常，这是最有希望进行病因学治疗的致病因素，它在形成 OSAHS 和疾病发展中的作用如何？是否是主要始动因素？②OSAHS 其他疑似病因，如遗传学、炎症及气道神经-肌张力调节功能障碍等，它们之间是否存在相互影响的因果关系？如果有，发生机制以及继发疾病的发生、发展、恶化的规律和检测指标是什么？③个性化评估、诊断和治疗，如何评估上气道结构异常、遗传学、炎症及神经肌肉调节失衡在患者个体 OSAHS 发病中的作用，以及分析确定患者个体的致病因素，进行有效、适时的预防和治疗干预？

在具备独立、量化检测 OSAHS 上述疑似病因技术手段的前提下，需要阐明两方面的主要证据。①直接证据：制造不同解剖部位结构异常和不同程度的动物模型，模拟 OSAHS 发生、发展与恶化过程以及与其他疑似致病因素的相互关系。②间接证据：设定前瞻性纵向队列研究，以初始时上气道解剖结构异常而无其他致病因素的患者作为观察对象，对比干预和非干预患者，查询其他致病危险因素随病程发展、变化的证据及特点；针对接受纠正解剖结构异常治疗的患者，探索其他疑似病因在改变解剖结构后的转归特点。目前由于研究技术手段、干扰控制等方面的限制，相关研究有限。

深入进行 OSAHS 病因学研究，明确相关疑似发病因素的作用、相互作用机制，以及疾病发生发展中的转归特点，将是一项长期的具有重大意义的研究课题。进行多中心的联合攻关研究，对于我们认识睡眠阻塞性疾病成因、发病机制，开展积极有效的预防和个性化治疗工作，提高人们的健康水准，大规模降低卫生经济学指标具有十分重要的战略意义。

参考文献

叶京英，王小轶，韩德民，等. 2005. 中老年女性阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征的社区调查. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志，40(8)，611～617

Amaki S, Yamauchi M, Fukuoka A, et al. 2009. Production of inflammatory mediators by monocytes in patients with obstructive sleep apnea syndrome. Intern Med, 48(15): 1255～1262

Ayappa I, Rapoport DM .2003. The upper airway in sleep: physiology of the pharynx .Sleep Med Rev ,7(1):9～33

Bradford A , McGuire M , O'Halloran KD .2005 .Does episodic hypoxia affect upper airway dilator muscle function Implications for the pathophysiology of obstructive sleep apnea .Respir Physiol Neurobiol ,147(2～3):223～234

Isono S , Morrison DL , Launois SH ,et al . 1993 . Static mechanics of the velopharynx of patients with obstructive sleep apnea .J Appl Physiol ,75(1):148～154

Kim J , In K , Kim J ,et al . 2004 . Prevalence of sleep-disordered breathing in middle-aged Korean men and women .Am J Respir Crit Care Med ,170(10):1108～1113

Peker Y , Hedner J , Norum J ,et al .2002 . Increased incidence of cardiovascular disease in middle-aged men with obstructive sleep apnea : a 7-year follow-up. Am J Respir Crit Care Med , 166(2):159～165

Schwab RJ , Pasirstein M , Pierson R ,et al . 2004 . Identification of upper airway anatomic risk factors for obstructive sleep apnea with volumetric magnetic resonance imaging . Am J Respir Crit Care Med ,168(5):522～530

Vgontzas N , Bixler O , Chrousos P . 2003 .Metabolic disturbances in obesity versus sleep apnoea : the importance of visceral obesity and insulin resistance .J Intern Med ,254(1):32～44

White DP . 2006 .The pathogenesis of obstructive sleep apnea : advances in the past 100 years . Am J Respir Cell Mol Biol ,34(1):1～6

撰稿人:韩德民

首都医科大学附属北京同仁医院

感音神经性聋生物学治疗策略

Biomedical Treatment Strategy for Sensorineural Hearing Loss

感音神经性聋发病的关键是各种致聋因素所致耳蜗感受器毛细胞及其连接的螺旋神经节神经元功能障碍及损伤死亡。由于耳蜗毛细胞及螺旋神经节神经元不能自发再生，一旦发生将造成永久性耳聋，使感音神经性聋的治疗成为医学难题。目前对感音神经性聋尚无理想的治疗方法，临床上人工耳蜗植入及助听器佩戴使得部分中重度感音神经性聋患者获得了部分听力康复。

促进耳蜗毛细胞及螺旋神经节神经元再生有两种途径：一是外源性干细胞移植重建耳蜗结构；二是促进耳蜗毛细胞再生修复耳蜗感受器。

研究发现内耳前庭毛细胞具有低水平的再生能力，2003 年发现成年鼠内耳存在多潜能干细胞，内耳干细胞具有高增殖活性，具有分化为毛细胞和螺旋神经节神经元的潜能，这些研究不但揭示了内耳毛细胞再生的根源，并且为干细胞移植治疗感音神经性聋提供了理论及实验依据。另外一项研究显示，胚胎干细胞经过体外诱导可以分化为内耳前体细胞，胚胎干细胞源前体细胞植入鸡胚内耳可分化为毛细胞，这两项研究开创了细胞移植治疗感音神经性聋的新途径。近年来听觉医学再生领域在诱导性多潜能干细胞内耳移植替代损伤的螺旋神经节神经元及人胚胎内耳干细胞诱导分化为毛细胞等领域的研究取得了进展。近年来我国开展了与国际同步的应用干细胞移植替代死亡毛细胞及螺旋神经节神经元的研究，如发现耳蜗高增殖活性细胞具有分化为毛细胞的能力；成体内耳干细胞耳蜗移植诱导分化为具有功能的螺旋神经节神经元；声诱导耳蜗植入神经干细胞分化为毛细胞及螺旋神经节神经元等。细胞移植替代损伤的毛细胞及螺旋神经节神经元修复损伤耳蜗的成果为生物学治疗感音神经性聋展示了广阔的前景。

外源性干细胞耳蜗移植存在的主要问题在于移植干细胞准确迁移到损伤部位并分化为毛细胞及螺旋神经节神经元的效率低下，尚不能准确定向诱导移植细胞分化为所需要的毛细胞或螺旋神经节神经元，主要原因是移植后干细胞处于自然迁移和分化的状态，缺乏定向迁移和分化的能力，今后需要重点研究耳蜗移植细胞的定向迁移调控及定向分化为需要的毛细胞及螺旋神经节神经元。

理想的治疗感音神经性聋的方法是通过生物学技术修复受损伤的耳蜗，达到结构和功能修复。通过改良病毒载体及转基因途径，基因治疗感音神经性聋的研究取得了令人瞩目的结果。国外学者应用腺病毒将 Atoh1 基因转入成年耳聋鼠

的耳蜗中阶，成功地诱导耳蜗感受器中支持细胞转分化为毛细胞，并达到了部分听觉功能修复，首次报道了应用生物学基因治疗技术成功治疗感音神经性聋的实验研究。经子宫胚胎鼠内耳基因转染技术的建立为早期基因干预奠定了基础，研究者将 Atoh1 基因经子宫转入胎鼠耳囊后，耳蜗感受器产生大量的具有功能的毛细胞，诱导产生的毛细胞与螺旋神经节神经元形成突触连接，开辟了在胚胎期激活毛细胞再生及纠正基因缺陷的新途径。我国基因治疗感音神经性聋的研究刚刚起步，在耳蜗基因转入技术的改良及转基因激活毛细胞再生方面取得了一些成果。

随着基因工程技术的发展，基因治疗为攻克感音神经性聋这一顽症带来了新希望。针对感音神经性聋的基因治疗有两种可能：一是转入调控耳蜗前体细胞增殖和毛细胞分化的关键基因，激活耳蜗毛细胞再生，治疗毛细胞损伤或死亡导致的感音神经性聋；二是通过转入正常野生型基因治疗遗传缺陷导致的耳聋。

由于约 80% 的感音神经性聋是由毛细胞损伤死亡造成的，因此，基因治疗毛细胞损伤死亡导致的感音神经性聋具有重大价值和临床应用前景。耳蜗毛细胞分化成熟后处于静止状态，不具有重新进入细胞周期增殖和再生能力。目前的研究发现，新生鼠耳蜗存在具有增殖活性的前体细胞，并且新生鼠耳蜗支持细胞也具有增殖及转分化为毛细胞的功能。但成年哺乳动物及人类耳蜗毛细胞不具有再生能力，如何激活成年哺乳动物及人类耳蜗毛细胞再生是科学家攻关的难题，国内外已经开展了调控细胞周期激活毛细胞再生的研究，该领域如果获得突破性进展将解开感音神经性聋不能治愈的难题。

先天性聋多数是由遗传缺陷导致的，给家庭及社会带来了巨大的负担。由 GJB 基因编码的缝隙连接蛋白的突变导致的遗传性聋最为引人注意，这是因为在世界多个不同人种中进行的大量普查显示由 connexin26（Cx26）和 connexin30（Cx30）突变导致的非综合性遗传性聋占到 20% ～60% 的病例，有数百万耳聋患者是因 GJB 基因突变导致的。已有研究应用转基因鼠模型，在 Cx30 缺失突变鼠内耳过量表达 Cx26 基因可以使 Cx30 缺失突变鼠听力恢复正常，完全治愈单基因 Cx30 缺失突变导致的耳聋，这项研究为遗传缺陷所致耳聋的基因治疗开辟了一条新途径。大前庭水管综合征（EVA）导致的听力障碍是最常见的遗传性聋病之一，约占全部遗传性聋的 12%。与其他遗传性先天性聋不同，EVA 聋多发生于 2 岁后的儿童期，且听力往往呈波动性、渐行性下降，这为早期基因治疗提供了宝贵的时间段，因此有可能成为遗传性聋基因治疗研究的首要突破口。

感音神经性聋的生物学治疗虽然取得了可喜的进展，目前尚在实验研究阶段，相信在不远的将来该领域的研究可以获得重大突破，造福感音神经性聋患者。

参考文献

Ahmad S, Tang W, Chang Q, et al. 2007. Restoration of connexin26 protein level in the cochlea completely rescues hearing in a mouse model of human connexin30-linked deafness. Proc Natl Acad Sci USA, 104(4): 1337～1341

Gubbels SP, Woessner DW, Mitchell JC, et al. 2008. Functional auditory hair cells produced in the mammalian cochlea by in utero gene transfer. Nature, 455(7212): 537～541

Izumikawa M, Minoda R, Kawamoto K, et al. 2005. Auditory hair cell replacement and hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals. Nat Med, 11(3): 271～276

Li H, Corrales CE, Edge A, et al. 2004. Stem cells as therapy for hearing loss. Trends Mol Med, 10(7): 309～315

Li H, Liu H, Heller S. 2003. Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. Nat Med, 9(10): 1293～1299

Li H, Roblin G, Liu H, et al. 2003. Generation of hair cells by stepwise differentiation of embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA, 100(23): 13495～13500

Malekpour M, Napoli DJ, Papsin BC, et al. 2008. Cochlear Implants. N Engl J Med, 358: 1522

Oshima K, Heller S. 2005. Sound from silence. Nat Med, 11(3): 249～250

Pera A, Dossena S, Rodighiero S, et al. 2008. Functional assessment of allelic variants in the SLC26A4 gene involved in Pendred syndrome and nonsyndromic EVA. Proc Natl Acad Sci USA, 105(47): 18608～18613

White PM, Doetzlhofer A, Lee YS, et al. 2006. Mammalian cochlear supporting cells can divide and trans-differentiate into hair cells. Nature, 441(7096): 984～987

撰稿人:李华伟
复旦大学附属眼耳鼻喉科医院

贝尔面瘫的病因及治疗

Pathogenesis and Management of Bell's Palsy

贝尔面瘫又称为“特发性周围性面神经麻痹”，是指原因不明的急性周围性面神经麻痹，是为纪念19世纪英国神经学家Charles Bell（1774～1842）在面神经研究领域所做出的杰出贡献而命名的。1821年，他在给皇家学会的信中描述了第七对脑神经损伤导致的面瘫，首次连同面神经的解剖和功能一起描述了该综合征。贝尔面瘫的临床表现为面部表情肌的运动障碍，出现患侧额纹消失，不能皱眉；睑裂扩大、闭合不全；口角歪斜、下垂，上下唇不能紧密闭合等。发病后进展迅速，约50%的患者在发病2天内面瘫达到最严重的程度，绝大多数患者在5天内都达到高峰，可表现为完全性或不完全性面瘫。绝大多数患者为单侧面瘫，不足1%的患者双侧发病。贝尔面瘫任何年龄均可发病，发病高峰为40余岁，发病率无性别或左右侧差异。有贝尔面瘫病史者，复发率为8%。70%～85%的患者在发病后3周内即使不经过治疗也可以完全或部分康复。

国内外各地区报道的贝尔面瘫发病率差异较大，年发病率为0.15‰～0.3‰，约占周围性面瘫患者总数的2/3。由于面瘫对患者的容貌及生活都会产生巨大影响，近200年来，耳鼻咽喉科、神经内科等相关学科学者对于该病的预防、诊断治疗都进行了艰辛的探索。尽管取得了一些进展，但该病的发病机制、预防和治疗一直没有突破，目前仍是一个世界级医学难题。

目前研究主要集中在以下几个方面：

1. 致病机制的研究

（1）通过流行病学的方法发现寒冷、感冒、过劳、骨Paget病、恶性高血压、妊娠和糖尿病等为本病的诱发因素，与种族、环境、气候和地理差异等因素有关，但都没有经过后来的实验和治疗所证实。

（2）1型单纯疱疹病毒（HSV-1）感染是目前讨论较多的假说之一，病毒可以通过直接感染或者导致不明机制的免疫反应导致面瘫，支持该论点的证据有：①在神经内液中发现HSV-1 DNA；②有研究发现面瘫发作与膝状神经节内潜伏的病毒激活有关；③在贝尔面瘫的患者唾液中HSV-1浓度高于正常人。不支持的证据有：①在没有面瘫的人的膝状神经节也发现了HSV；②贝尔面瘫患者的HSV滴度并不比正常人高；③贝尔面瘫患者的脑脊液中并没有发现HSV；④研究不能将活检标本中的病毒DNA分离。

（3）另一个比较得到认可的致病因素是微循环障碍学说：血管神经的功能紊乱引起茎乳孔周围的小动脉痉挛，引起面神经的首发性缺血，接着出现静脉充血和炎性水肿，引起局部压力增加，导致面神经的继发性缺血。支持的证据有：①贝尔面瘫夜间、晨起发病率高；②贝尔面瘫患者血浆内皮素（有力的血管收缩因子）较正常人高；③发病多与冷空气有关。不支持的证据有：①很多贝尔面瘫的患者并没有冷空气刺激病史；②改善微循环药物只能使部分患者缓解。

（4）免疫学说，包括免疫功能降低和自身免疫病两种观点。糖尿病患者和妊娠期妇女发病率较高，提示可能与免疫功能降低有关。而激素治疗贝尔面瘫有效，故有学者认为该病是自身免疫所致。免疫学说缺乏充足的证据，但在贝尔面瘫的发病过程中可能有协同作用。

2. 由于致病机制没有明确，治疗缺乏依据

（1）手术治疗，虽然各种学说认为的病因和发病机制不同，但神经肿胀的病理生理改变是大家所一致认可的，这是对贝尔面瘫患者进行面神经减压的病理生理学基础。尽管有不少报道认为面神经减压术效果满意，但是也有荟萃分析认为没有证据证明面神经减压术有效，如美国神经病学会质量标准小组 2001 年的报告认为：所有外科治疗的研究报道都存在较多偏倚，不能得出循证证据结论，并且面神经减压术有听力损失等并发症发生，鉴于这些原因，不推荐手术治疗。

（2）基于贝尔面瘫患者面神经肿胀改变的发现以及该病可能与病毒感染相关，药物治疗上选择使用糖皮质激素以减轻水肿和炎症，抗病毒药物以抑制病毒复制。多数研究也支持这样的方案，但是具体的治疗方案各家差异很大，如日本 Hato 等认为联合应用抗病毒药（伐昔洛韦）优于单独应用泼尼松龙，而在苏格兰进行的一项更为严格的双盲、安慰剂对照、随机、多中心研究却认为没有明确证据表明阿昔洛韦优于泼尼松龙，或者泼尼松龙和阿昔洛韦的联合应用优于单独使用泼尼松龙。哪种方案更有效尚无定论，但比较明确的是不论哪一种方案都有大量治疗效果不佳的患者。

（3）关于物理治疗的论文很多，但没有研究提供物理治疗相对于对照组能明显改善患者症状。关于针灸的荟萃分析认为，由于研究设计差，病例观察少，没有能提供治疗有效的证据。

（4）2008 年国内有学者利用中医药的优势，提出了利用 β-七叶皂苷钠的强消肿和抗渗出的作用治疗贝尔面瘫的设想，但都没有最终证实有效。

3. 主要的难点

（1）贝尔面瘫的致病机制到底是什么？在临床研究中相同或类似的措施得到不同的结论，是否提示我们这样一个问题：贝尔面瘫可能是不同原因导致的面神经功能受损但可恢复的过程，即为致病机制不同但临床表现类似的一组症状？

（2）尽管绝大多数贝尔面瘫的患者可以自愈，但是对于一些特殊的人和特殊

情况下，需要尽快改善症状，我们应该怎么办？

（3）对于那些不能自愈，治疗也无效的贝尔面瘫患者应该如何改善他们的生活质量？

参考文献

迟放鲁，高志强，孙建军，等. 2007. 面神经疾病. 上海：上海科学技术出版社，226～243

高志强. 2006. Bell面瘫的诊断、鉴别诊断与治疗. 继续医学教育，20(20)：60～63

Gilden DH. 2004. Clinical practice—Bell's palsy. N Engl J Med，351(13)：1323～1331

Holland NJ，Weiner GM. 2004. Recent developments in Bell's palsy. BMJ，329：555～557

Kanerva M，Mannonen L，Piiparinen H，et al. 2007. Search for herpesviruses in cerebrospinal fluid of facial palsy patients by PCR. Acta Otolaryngol，127(7)：775～779

Konstantinos Spengos，Sofia Sameli，Georgios Stouraitis，et al. 2006. Seasonal variation of Bell's palsy in Athens，Greece—a hospital-based retrospective evaluation over fifteen years. European Neurology，55(2)：84～88

Lazarini PR，Vianna MF，Alcantara MP，et al. 2006. Herpes simplex virus in the saliva of peripheral Bell's palsy patients (in Portuguese). Rev Bras Otorrinolaringol (Engl Ed)，72(1)：7～11

Minnerop M，Herbst M，Fimmers R，et al. 2008. Bell's palsy：combined treatment of famciclovir and prednisone is superior to prednisone alone. J Neurol，3：1～5

Schaitkin BM，May M，Podvinec M，et al. 2000. Idiopathic (Bell's) palsy，herpes zoster cephalicus，and other facial nerve disorders of viral origin. In：May M，Schcitkin BM，eds. The Facial Nerve. 2nd ed. New York：Thieme，319～338

撰稿人：高志强　崔婷婷

北京协和医院

过敏性鼻炎的发病机制

Allergic Rhinitis

过敏性鼻炎是机体接触过敏原后产生的以打喷嚏、流清涕、鼻塞和鼻痒为主要症状的鼻部炎症性疾病。患者常常伴随哮喘、中耳炎、鼻窦炎等并发症，除此之外，过敏性鼻炎的症状控制不佳还会引起睡眠障碍和情绪问题，严重影响患者的日常生活、工作和学习。

过敏性鼻炎已成为全球性的健康问题。保守估计，世界上有超过5亿的过敏性鼻炎患者。我国11个中心城市自报过敏性鼻炎患病率的调查显示其患病率在8%～16%，个别城市（乌鲁木齐）超过20%。而且过去30年间，过敏性鼻炎的患病率仍保持上升态势，说明现有的诊疗措施并未能在总体上控制过敏性鼻炎的患病状况。其核心原因在于过敏性鼻炎病因的多因素、多环节性及发病机制的复杂性。

目前认为过敏性鼻炎的发病原因可能是由于机体外周免疫耐受功能缺失，在遗传因素和环境因素共同作用下，针对一些原本“无害的”（innocuous）的物质——变应原（如花粉、尘螨）产生的以Th2反应过度活跃的免疫反应。遗传因素在过敏性鼻炎发病中的作用和探寻疾病易感基因是目前学者们对过敏性鼻炎研究的热点。人类主要组织相容性系统（human leukocyte A system，HLA）复合体是具有高度多态性的基因系统，其中的多种抗原如HLA-B8、HLA-DR3、HLA-DR4、HLA-DR7和HLA-DQ2已被证明与季节性过敏性鼻炎的发病有关。但是在以上多种易感基因中，究竟哪一个是过敏性鼻炎的主要易感基因，抑或这些基因形成怎样的相互关联的网络，到目前为止仍然是未解的难题。

影响过敏性鼻炎的环境因素，目前可以临床检测的有室外过敏原（主要包括花粉和真菌）及室内过敏原（螨虫、动物皮屑、昆虫及真菌）。但是空气污染、职业暴露及吸烟等因素是否作为过敏原导致过敏性鼻炎发生，还是仅仅增加了鼻黏膜的反应性，尚有待于进一步阐明。

除此之外，城乡差异、儿童发育期的生活方式和饮食结构等也一度被提出与过敏性鼻炎的发病有关。例如城市过敏性鼻炎的患病率高于乡村，严重的寄生虫感染或感染性疾病可与过敏性鼻炎发病呈负相关，儿童发育期家庭内的交叉感染可以预防过敏性鼻炎的发生等多个研究结果提示了相对“无菌”的环境趋于促进过敏性鼻炎的发生。因此，1989年Strachan提出卫生假说（hygiene hypothesis），即感染和不卫生的接触有可能对过敏性鼻炎的发生发展起保护作用。但是

目前对此假说仍有许多问题尚待解决，特别是关于保护型感染的本质，保护作用的机制，与假说相关的疾病谱，触发过敏的感染与保护性感染之间有何不同，以及如何通过模拟感染的效应设计相应的治疗策略。另外，卫生假说也面临着新发现的挑战，有研究表明城市中相对贫困地区儿童过敏性疾病的患病率并不低于富裕地区儿童，可能与过多摄入垃圾食品和运动不足有关。由此表明，过敏性鼻炎发病机制的复杂性决定了单一机制无法解说多因素多环节的过敏性鼻炎。

对过敏性鼻炎发病机制的研究与病因的研究是相辅相成的。从免疫学角度来看，过敏性鼻炎是 IgE 介导的以鼻腔黏膜 Th2 免疫反应为主的变态反应性炎症，因此也被称为变应性鼻炎。当吸入变应原开始作用于鼻黏膜表面时，肥大细胞在鼻黏膜内的聚集是过敏性鼻炎病理生理过程中重要的一环 。再次暴露于特异性变应原可以引发附着在受体上的 IgE 分子的聚合，导致了介质组胺、白三烯等释放，从而产生变态反应。在此过程中多种细胞、介质、细胞因子、趋化因子、神经肽及黏附分子在一个复杂的网络系统内协同作用，激发了过敏性鼻炎的特异性症状和非特异性鼻部高反应性。近十年随着调节性 T 细胞（Treg）的发现，对过敏性鼻炎的认识转移到调节性 T 细胞作用的研究，并且认为 Treg 在机体外周免疫耐受功能中有重要作用。学者们提出假设，认为正常情况下具有免疫抑制活性的 Treg 可以维持体内 Th1 和 Th2 细胞的平衡，而对于特应性个体而言，可能由于 Treg 功能的缺陷，失去了对效应性 T 细胞反应的抑制作用，从而引发了过度的、失调控的 Th2 型反应。但是 Treg 功能缺陷的免疫学机制至今尚不明确，仍是学者们面临的一个重大难题。

虽然过敏性鼻炎的发病部位限定在鼻腔黏膜，但与邻近的鼻窦以及气管、支气管和远端部位（骨髓）有密切关联，相互影响。1997 年，Grossman 提出“同一气道，同一疾病”的观点，体现了对以过敏性鼻炎和变应性哮喘为代表的上下呼吸道疾病关联性的认识；2001 年和 2008 年，世界卫生组织参与撰写发表“过敏性鼻炎及其对哮喘的影响”（allergic rhinitis and its impact on asthma，ARIA），系统地介绍了过敏性鼻炎相关基础和临床研究现状。2003 年 Borish 提出，局部过敏性疾病的症状是全身免疫调节异常的表现，骨髓反应是联系的重要机制。迄今为止，有关过敏性鼻炎与支气管哮喘以及与慢性鼻窦炎、中耳炎和睡眠疾病等关系的研究方兴未艾。

上述理论研究的难点反映在临床诊疗工作中的难点：

首先，临床欠缺统一而稳定的诊断标准，尽管目前体内皮肤点刺试验和体外血清特异性 IgE 检测是临床常用的诊断手段，但二者的敏感性和特异性仍有不足，对于假阳性和假阴性的出现不能得到客观的解释。

其次，治疗手段不够丰富，疗效欠佳。现有的治疗体系主要由避免接触变应原、药物治疗和特异性变应原免疫治疗构成，但在临床可操作性、近期和远期疗效等方面又各有不足。对动物皮毛过敏的患者接触过敏原如出现症状，避免接触动物可以有效地减轻症状，但是对于部分患者，即便不接触过敏原，依旧在一些特定因素刺激下出

现鼻腔症状，其原因尚待进一步研究。用于过敏性鼻炎的药物最常见的是通过鼻内或口服给药，但在过敏性鼻炎漫长的治疗过程中，不少患者有过更换药物的经历，美国一项调查显示患者更换药物和不遵从医嘱的最主要原因是疗效不佳，53% 的患者认为随着时间的推移，药效会逐渐减弱，表明目前的药物还难以满足过敏性鼻炎需要长期治疗的现实。特异性变应原免疫治疗是以递增剂量的方式给予患者变应原提取物，以改善此后暴露于致敏变应原时产生的症状。它诱导了临床和免疫耐受，具有长期效果，可预防过敏性疾病的发展。但是由于变应原的多样性，患者的个体化差异及免疫治疗机制的复杂性，为免疫治疗的疗效和安全性增加了诸多不确定因素。

过敏性鼻炎不仅仅是单一出现鼻腔症状的疾病，它明显受到遗传和复杂的周围环境因素的影响，并且与周围器官，甚至全身免疫系统之间具有密不可分的关联。现有的诊疗措施未能在总体上控制过敏性鼻炎的患病状况，可能是我们并未找到控制疾病的核心因素。深入了解过敏性鼻炎的发病机制和关键影响因素是解决问题的主要策略，也是取得良好疗效的前提。因此，对过敏性鼻炎的治疗仍是一个长期和艰巨的过程。

参考文献

Borish L. 2003. Allergic rhinitis: systemic inflammation and implications for management. J Allergy Clin Immunol, 112: 1021～1031

Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, et al. 2008. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) 2008 update. Allergy, 63 (Suppl 86): 8～160

Bullens DM. 2008. Searching for regulatory T cells in allergy: are we nearing the “finish”? Clin Exp Allergy, 38 (11): 1707～1708

Dávila I, Mullol J, Ferrer M, et al. 2009. Genetic aspects of allergic rhinitis. J Investig Allergol Clin Immunol, 19 (Suppl 1): 25～31

Grossman J. 1997. One airway, one disease. Chest, 111 (2 Suppl): 11S～16S

Platts-Mills TA, Erwin E, Heymann P, et al. 2005. Is the hygiene hypothesis still a viable explanation for the increased prevalence of asthma? Allergy, 60 (Suppl 79): 25～31

Ricca V, Landi M, Ferrero P, et al. 2000. Minimal persistent inflammation is also present in patients with seasonal allergic rhinitis. J Allergy Clin Immunol, 105: 54～57

Strachan DP. 1989. Hay fever, hygiene, and household size. BMJ, 299: 1259～1260

Zhang L, Han D, Huang D, et al. 2009. Prevalence of self-reported allergic rhinitis in eleven major cities in china. Int Arch Allergy Immunol, 149 (1): 47～57

撰稿人：张　罗[1]　欧阳昱晖[2]

1 首都医科大学附属北京同仁医院

2 教育部耳鼻咽喉科学重点实验室、北京市耳鼻咽喉学科研究所

头颈鳞癌治疗抵抗和复发的发生机制

Mechanisms of Therapeutic Resistance and Recurrence in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

尽管外科手术技术日趋成熟，但近20年头颈鳞癌的5年生存率并没有得到明显提高，其主要原因是肿瘤的复发和转移。对许多晚期原发和复发的头颈鳞癌，由于肿瘤侵及范围过大，手术无法切除和治愈。对于发生全身转移的病例，外科手术更是无能为力。因此，人们一直在探索除外科手术以外的综合与辅助治疗方法，其中最为主要的是不同方式的放疗、化疗和联合放化疗，以达到延长和挽救头颈鳞癌患者生命的目的。

但临床观察发现，头颈鳞癌对放、化疗敏感性低，抵抗力强，疗效不佳。主要表现在头颈鳞癌（包括原发癌和复发癌）放、化疗治疗时，许多肿瘤对治疗无反应，有些在治疗后短期内肿瘤可以明显缩小或肉眼下消失，但在经过长短不等的缓解期后肿瘤即再生或复发，并最终导致患者死亡。所以，放、化疗抵抗和复发一直是头颈鳞癌治疗中一个令人困扰和亟待解决的疑难问题。解决这一问题对改善头颈鳞癌的治疗效果、延长和挽救患者的生命都具有十分重要的意义。

头颈鳞癌放、化疗抵抗和复发的原因错综复杂。其中，肿瘤局部组织缺氧造成的低氧微环境与肿瘤治疗抵抗和复发的关系密不可分。已经证明，绝大多数实体瘤内氧分压低于肿瘤起源的正常组织，而低氧诱导因子（hypoxia-inducible factor，HIF）是肿瘤细胞供氧和供能的中心调控因子，也是肿瘤适应低氧环境和诱导相关基因表达并克服低氧这一不利因素的中间环节。低氧可以诱发细胞内HIF-1α的表达并发挥其特定的生物学效应，其作用主要包括：①诱导碳酸酐酶表达增加，使细胞内pH保持不变，避免细胞因各种因素所导致的凋亡发生；②诱导多药耐药基因（multiple drug resistance，MDR）及其产物P-糖蛋白（P-glycoprotein，P-gp）的表达，并且低氧环境下P-gp活性增加近7倍；③调节在DNA双链断裂修复中起重要作用的DNA蛋白激酶（DNA-PK）表达水平及活性，促进DNA损伤的修复和HIF-1α的自身稳定；④HIF-1α不仅是血管内皮生长因子（vascular endothelium growth factor，VEGF）基因和糖酵解过程中多种关键酶基因的上游调节基因，调节细胞糖代谢和肿瘤组织血管生成，还与p53基因协同作用影响细胞周期调控和细胞凋亡；⑤诱导survivin、cIAP和XIAP等凋亡抑制蛋白的表达，并抑制促凋亡蛋白Bax和caspase活性而抑制肿瘤细胞凋

亡。在对头颈鳞癌的研究中发现，低氧可以明显增加头颈鳞癌 Hep-2 细胞 HIF-1α蛋白的表达，并且 HIF-1α 的过度表达可以造成肿瘤细胞发生 G_0/G_1 期阻滞，并可以使肿瘤细胞内 VEGF 和 p53 蛋白水平升高，通过调节肿瘤微血管形成和细胞凋亡导致肿瘤对放、化疗产生抵抗；通过 HIF-1α 反义寡核苷酸转染可以明显抑制低氧引起的 HIF-1α 表达增高，明显减少 G_0/G_1 细胞阻滞，改变其下游调节蛋白的表达水平，对细胞增殖和凋亡产生明显影响，使得肿瘤细胞对放疗的敏感性明显增加。所以，肿瘤微环境低氧诱导的治疗抵抗是通过调节细胞能量代谢、增殖与凋亡和微血管生成等途径来实现的。

新近的研究证明，肿瘤治疗抵抗主要可能发生在少部分处于静止期和具有自我更新能力的细胞群，这部分细胞具有特殊的细胞标志和干细胞特性，被称为肿瘤干细胞（cancer stem cell，CSC）。已有学者在多种肿瘤细胞中发现 CSC 或类 CSC，认为其在肿瘤的发生发展、侵袭、转移和复发中起重要作用。2007 年，Prince 等首次在头颈鳞癌组织中分离出具有干细胞特性和 $CD44^+$ 细胞表面标志的一组细胞群；同年，Zhou 等发现人头颈鳞癌 Hep-2 细胞系中带有 $CD133^+$ 细胞标志的细胞亚群具有干细胞的特性；随后又有学者在人口腔鳞癌组织细胞中鉴定出 $CD133^+$ 并具有化疗抵抗性的 CSC 样细胞。最近国内有学者在人喉鳞癌组织细胞中分离出具有 $CD44^+$ 细胞标志的 CSC。所有这些都充分证明头颈鳞癌中确实存在 CSC，这一事实为进一步从 CSC 的角度研究头颈鳞癌对放、化疗抵抗和复发的机制，以及克服放、化疗抵抗和复发提供了新的思路和切入点。

CSC 是肿瘤细胞中的一个亚群，与分化成熟的肿瘤细胞共处同一环境中，肿瘤生长局部微环境中的低氧状态也构成了 CSC 生长的必然环境，并可以直接影响 CSC 的自我更新和分化。已经发现，HIF-1α 可以诱导与 CSC 自我更新和多能性相关基因如 Oct4 和 Notch1 的表达，在低氧环境下，白血病 CSC 中 HIF-1α的稳定表达可以通过刺激 Oct4 和 Notch1 及其关键的信号转导通路促进 CSC 特性和多能性的发挥。基于上述发现，我们可以初步确立低氧微环境与头颈鳞癌 CSC 相互作用的概念。从这一角度上理解，过去认为肿瘤放、化疗后体积缩小为治疗方案有效，但绝大多数肿瘤经过一段时间缓解期后会再度复发，可能是因为放、化疗只杀灭了快速分裂、分化成熟的肿瘤细胞，而没有杀灭在低氧微环境下呈慢周期分裂增殖并具有治疗抵抗作用的 CSC，后者能够在放、化疗结束后合适的时间和环境下驱动肿瘤再生。

目前，低氧对头颈鳞癌 CSC 的影响及其与放、化疗抵抗的关系仍不清楚。要想从肿瘤微环境对肿瘤细胞影响的角度在更深层次阐明头颈鳞癌放、化疗抵抗和复发的原因，首先必须对低氧微环境对头颈鳞癌 CSC 调控的过程和机制进行深入研究。即在建立 HIF-1α 基因敲除（$HIF\text{-}1\alpha^{-/-}$）细胞系的同时，通过低氧和常氧条件培养正常表达 HIF-1α（$HIF\text{-}1\alpha^{+/+}$）细胞和 $HIF\text{-}1\alpha^{-/-}$ 细胞，观察

HIF-1α 诱导与 CSC 自我更新和多能性相关的基因的表达情况，研究比较在常氧和低氧培养环境下这些基因在 $CD133^+$ 和 $CD133^-$ 细胞中的差异表达情况与 $CD133^+$ CSC 增殖能力的关系，从而明确低氧微环境是否通过 HIF-1α 调节头颈鳞癌 CSC 的分化与增殖。在此基础上，通过转基因手段阻断 HIF-1α 表达或采取有效办法彻底改善肿瘤微环境低氧状态，有效阻断低氧造成的 HIF-1α 激活，从而克服低氧诱发的肿瘤放、化疗抵抗和复发。其中，转基因技术主要针对 HIF-1α信号转导通路上的关键靶基因及其蛋白产物与 HIF-1α 的旁侧激活和调节通路上的细胞因子，后者主要涉及 EGFR 和 STAT3 信号旁侧激活通路对 HIF-1α 的调节作用。由于目前转基因技术在人体应用具有一定的局限性，同时基因阻断的靶点存在单一性，并且其对头颈鳞癌 CSC 的靶向性难以确定，因此，将转基因技术作为有效改善头颈鳞癌治疗抵抗的有效方法尚需要相当长一段时间的研究和探索，其重点是解决多靶点同时阻断 HIF-1α 的主要和旁侧激活与调节通路以及阻断方法对头颈鳞癌 CSC 的特异性和细胞靶向性问题。在阻断 HIF-1α 的旁侧激活和调节通路上的细胞因子 EGFR 和 STAT3 信号通路方面可以探索联合应用二者相应的抑制剂（如 cetuximab 和 AG490 等），进一步通过结合有效改善肿瘤局部微环境低氧状况的途径和方法，有望彻底消除低氧微环境对头颈鳞癌放、化疗抵抗和复发的影响作用。针对改善肿瘤微环境低氧的策略，近来有人尝试吸入 carbogen（95% O_2 和 5% CO_2 的混合气体）和高压氧舱等方法用以改善肿瘤局部的低氧微环境和肿瘤的治疗抵抗，但实际效果相当有限。所以，根据肿瘤局部微循环的特点，非常有必要对传统和常规的改善组织氧分压的方法和途径进行改进，如探索肿瘤组织局部弥散式给氧，但其具体的步骤、实施过程和有效性还有待于进一步探索和深入研究。虽然通过方法改进可以使肿瘤组织局部低氧状况得到改善，但影像学上观察到的结果与肿瘤细胞内源性缺氧标志物检测的实际结果的符合性较差，说明肿瘤组织局部氧分压恢复正常不能代表肿瘤细胞内缺氧代谢状况的彻底改善和纠正。因此，我们提出一个新的概念，即“肿瘤组织氧分压恢复正常与肿瘤细胞低氧代谢状况彻底改善和恢复之间可能存在着一定的窗口期”。目前，这一窗口时间仍不清楚。通过体外和在体实验对改善肿瘤微环境低氧状况的有效途径和客观评估方法进行深入研究并确定上述的“窗口期”，对明确肿瘤细胞低氧代谢状况改善程度及其对头颈鳞癌对放、化疗抵抗和复发的影响以及消除放、化疗抵抗具有重要意义。

肿瘤低氧微环境与 CSC 相互作用概念的提出和确立使我们对头颈鳞癌治疗抵抗和复发的认识更进了一步。当把根除肿瘤干细胞最终作为治愈癌症的目标时，以肿瘤低氧微环境对 CSC 影响作为干预和治疗靶点就更加具有前景和吸引力。可以推测，CSC 可能是导致头颈鳞癌治疗抵抗和复发的重要中间环节，低氧微环境对 CSC 的影响在头颈鳞癌治疗抵抗和复发过程中具有重要作用。通过

在肿瘤放、化疗时有效改善肿瘤微环境的低氧状态和调控与 CSC 相关的重要细胞信号通路，有望从根本上改变头颈鳞癌细胞对放、化疗的敏感性，并有效减少肿瘤治疗抵抗和复发，从而达到改善头颈鳞癌治疗效果、延长和挽救这类患者生命的目的。

参考文献

刘春玲，李晓明，路秀英，等. 2007. HIF-1α 反义寡核苷酸对喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞放疗的增敏作用. 临床耳鼻咽喉科杂志，21：605～608

于丹，金春顺，赵胤，等. 2008. CD44+ 喉癌细胞的干细胞生物学特性初步研究. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志，43：845～850

Li X，Di B，Shang Y，et al. 2009. Clinicopathologic risk factors for distant metastases from head and neck squamous cell carcinomas. Euro J Surg Oncol，35：1348～1353

Prince NE，Sivanandan R，Kaczorowski，et al. 2007. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. PNAS，104：973～978

Rademakers SE，Span PN，Kaanders JH，et al. 2008. Molecular aspects of tumor hypoxia. Molecular Oncology，2：41～53

Semenza GL. 2010. HIF-1：upstream and downstream of cancer metabolism. Current Opinion in Genetics & Development，20：51～56

Winquist RJ，Boucher DM，Wood M，et al. 2009. Targeting cancer stem cell for more defective therapies：taking out cancer's locomotive engine. Boichem Pharmacol，78：326～334

Zhou L，Wei X，Cheng L，et al. 2007. CD133，one of the markers of stem cells in Hep-2 cell line. Laryngoscope，117：455～460

撰稿人：李晓明
白求恩国际和平医院

青光眼性视神经再生的明天：iPS 细胞向 RGC 的定向转化

The Future of Glaucomatous Neuron Regeneration：Convert iPS Cell to RGC

青光眼（glaucoma）作为首要的不可逆性致盲性眼病，是一组与病理性眼压升高有关、威胁和损害视神经视觉功能的临床综合征或眼病，由于其最终导致视网膜神经节细胞（retinal ganglion cell，RGC）的损伤和凋亡，而使视觉损伤难以恢复。据 WHO 统计，全世界约有 7000 万青光眼患者，其中近 10% 由于缺乏有效的治疗手段最终致盲。目前，青光眼的治疗主要围绕在降低眼压方面，然而眼压的降低并不能完全阻止病情的进展，不少患者的视力、视野仍然逐步减退。因此，研究、探索一种安全、高效、能促进损伤的 RGC 功能恢复甚至再生的方法成为治疗青光眼等致盲性眼病的希望！

干细胞（stem cell）是指具有自我更新、高度增殖和多向分化潜能的一类未分化细胞，主要分为胚胎干细胞（embryonic stem cell，ESC）和成体干细胞（adult stem cell，ASC），目前其在细胞替代治疗方面的研究正在如火如荼地开展。虽然通过干细胞体内移植并定向分化可以替代损伤坏死的 RGC，然而，由于干细胞（也称为种子细胞）来源有限、移植后免疫排斥反应及伦理学问题等，阻碍了其在青光眼性神经保护替代疗法中的应用。如何在不违背伦理学的前提下，获取大量自体来源的 RGC，并同时解决细胞替代治疗中的种子细胞来源有限和免疫排斥反应等难题是解决视神经再生的关键环节。为此，诱导的多潜能干细胞的诞生成为了青光眼治疗的新希望。

诱导的多潜能干细胞（iPS）技术是指利用已成熟分化的组织细胞，通过调节其细胞内的转录因子使其逆向分化、重新回到干细胞的起点，使成体细胞重编程的过程。最早使用的成体细胞重编程技术是核移植，最终产生了世界上第一只克隆的哺乳动物——多莉羊。尽管体细胞核移植是经典的重编程方法，但其技术难度高、效率低下、需要供体卵母细胞等，限制了其应用。近年研究发现，通过转入调控发育的关键基因或蛋白质，也可以使体细胞重编程。2006 年，Yamanaka S 通过转基因手段，将调控胚胎干细胞发育的 4 个关键基因，即 Oct3/4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 导入小鼠成纤维细胞，使之重编程为诱导的多潜能干细胞，该 iPS 细胞具有类似胚胎干细胞的全能性，可发育成有生命力的完整个体。随后的研究发现，不但是小鼠成纤维细胞，其他种属或其他类型的体细胞或成体干细胞，也可以通过转入类似的基因，重编程为 iPS 细胞，而重编程来源

的 iPS 细胞在分化潜能、各种生物学及表观遗传学特性方面都与胚胎干细胞高度相似。同时，iPS 细胞还可以进一步在特定条件下分化为所需要的种子细胞，如视网膜神经祖细胞、心肌细胞、造血干细胞等。通过转基因重编程，获取自体 iPS 细胞，并进一步分化为种子细胞，这对解决种子细胞来源、免疫排斥反应及伦理学问题等具有里程碑意义，因此，该项研究在 2007 年、2008 年连续两年被美国《Science》杂志评为年度十大科学进展之一。

尽管通过体细胞重编程可以获取大量的、自体来源的 iPS 细胞，然而如何实现 iPS 细胞向 RGC 的定向分化，是其用于解决青光眼神经保护及再生必须解决的关键问题。目前，已有学者通过添加生长因子或共培养等手段，诱导 iPS 细胞向视网膜神经祖细胞、感光细胞或视网膜色素上皮细胞方向分化，然而，尚鲜有定向诱导 iPS 细胞向 RGC 分化的报道。视网膜神经节细胞来自于早期的视网膜神经祖细胞，根据视网膜神经系统发育学理论基础，要实现 iPS 细胞向 RGC 的定向分化必然要利用各个发育阶段的特异性细胞因子，即发育的过程中 Pax6、Math5、Shh 和 Notch 所构成的一个调控网络诱导细胞特化、多种基因序贯发挥作用的完整体系，其中 Math5（在有些物种也称为 ath5）基因在 RGC 的产生中起着极其关键的作用。各国的研究表明，小鼠、蟾蜍、斑马鱼 ath5 基因的表达都在视网膜神经节细胞形成之前，ath5 基因的过表达，将使更多的 RGC 前体细胞分化为视网膜神经节细胞，但其他类型细胞因此减少。同样在小鼠中 Math5 表达是所有早期视网膜神经细胞发育所必需的，Math5 持续表达可促进视网膜神经节细胞产生，但抑制了其他早期视网膜神经细胞，包括视锥细胞、水平细胞和无长突细胞的产生。综合以上的研究结果我们不难发现，iPS 技术联合诱导分化技术为青光眼性视神经保护提供了不可估量的应用前景。

基于目前的研究现状，国内已有学者在 iPS 细胞的基础上联合细胞因子和 Math5 基因转染，序贯诱导 iPS 向 RGC 分化，并在青光眼性视神经退行性病变的小鼠中进行了 RGC 的移植，取得了令人振奋的研究成果，但其较低的整合效率以及视网膜功能恢复不佳成为进一步研究的焦点。如何能在已有研究成果的基础上进行微创化的细胞移植、降低 iPS 视网膜移植成瘤性的风险、提高 iPS 在 RGC 层的整合效率、建立功能性的细胞突触联系，将会大大促进 iPS 细胞在青光眼甚至所有的神经性致盲性眼病的视神经保护及再生中的应用，为青光眼病人重塑光明带来希望，提高个人及家庭的生活质量，为社会带来巨大的经济及社会效益。

参考文献

Aoi T, Yae K, Nakagawa M, et al. 2008. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. Science, 321: 699～702

Hirami Y, Osakada F, Takahashi K, et al. 2009. Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells. Neurosci Lett, 458: 126～131

Osakada F, Jin ZB, Hirami Y, et al. 2009. In vitro differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction. J Cell Sci, 122: 3169～3179

Quigley HA, Broman AT. 2006. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. Br J Ophthalmol, 90(3): 262～267

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell, 131: 861～872

Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell, 126: 663～676

Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, et al. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature, 385: 810～813

撰稿人：卓业鸿　白玉婧

中山大学中山眼科中心

年龄相关性黄斑变性的发病机制

Etiology of Age-Related Macular Degeneration

年龄相关性黄斑变性（age-related macular degeneration，AMD）是一种眼部衰老性疾病。临床上根据病变特点可分为两种主要类型：一种是干性 AMD，又称萎缩型 AMD，严重时可表现为地图样变性（geographic atrophy，GA），表现为黄斑区视网膜色素上皮细胞逐渐消失形成萎缩斑，导致相应区域内光感受器受损、中心视力显著下降；另一种为湿性 AMD，又称新生血管性 AMD，主要表现为黄斑区出现脉络膜新生血管（choroidal neovascularization，CNV），并进一步出血、形成瘢痕，中心视力急剧下降（图 1）。AMD 是一种常见眼病，我国 50 岁以上人群患病率为 7.6%～15.5%，已经逐步成为导致老年人不可逆盲的首要原因。该病恰好发生在人看东西最敏锐的黄斑区，严重损害视力，极大地影响了老年人的生活质量，许多患者生活不能自理，对其造成了巨大的生理和心理影

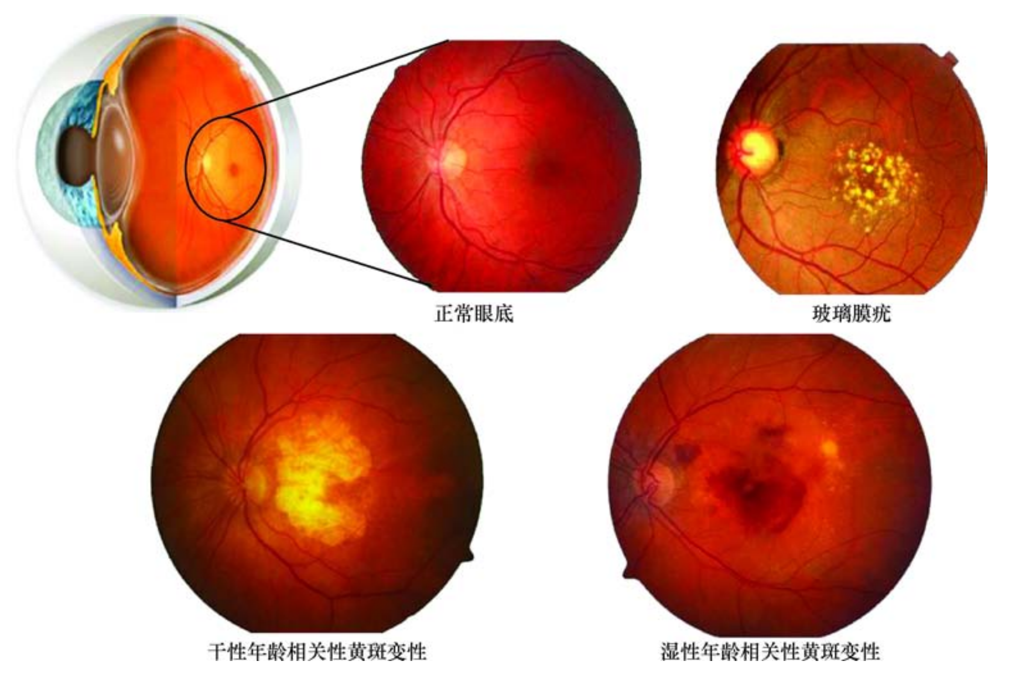


图 1　年龄相关性黄斑变性眼底表现

响。治疗方法需要发病机制来指导，进行对因治疗效果最佳，因此对 AMD 发病机制的研究成为眼科研究的热点。但通过图 1 可以看出，该疾病表现复杂，病程较长，并非单一发病因素所致，因此又成为眼病研究的难点。搞清楚发病机制，从中找到有效的治疗方法，将挽救我国 2140 万 AMD 患者的视力。

AMD 发病机制的研究经历了漫长的过程。最初，学者们使用病例对照方法，即调查一批 AMD 患者，同时调查一批与这些患者年龄、性别等因素相近的健康人，询问他们的生活习惯，分析他们的病史，发现 AMD 患者中吸烟者较多，食物中 ω-3 脂肪酸较少，患心脏病者较多，因此推测以上因素与 AMD 发病有关。但是，经典的研究方法有其局限性，比如不吸烟者也会患 AMD，因此并不能对治疗该病提出建设性指导意见。

进而，学者们对该病进行病理生理研究，希望将该病发病过程进行分解，从中找出发病原因。正常情况下，光线通过角膜、晶状体等屈光系统成像于眼底黄斑部视网膜，经过视网膜感光细胞（视杆、视锥细胞）将光信号转化为神经冲动而传入大脑。黄斑部作为光线汇聚处，光氧化应激作用最为明显，人体通过不断更新视杆和视锥细胞的感光部分而克服这种损伤，其外节不断脱落，被视网膜色素上皮（retinal pigmental epithelium，RPE）细胞吞噬，从而维持动态平衡。随着年龄的增加，感光细胞外节变性，同时 RPE 细胞吞噬功能也不断下降，脱落的外节被 RPE 细胞吞噬后积聚于 RPE 细胞内和 RPE 下，出现玻璃膜疣（drusen）的临床表现。这破坏了原有的抗氧化动态平衡，导致局部氧化应激过强，破坏了视网膜感光细胞和 RPE 细胞功能，同时激活了局部的免疫反应，出现局部炎症，导致病变由可逆的老年性改变发展为不可逆的黄斑变性。局部缺血缺氧状态导致 VEGF 等血管生成因子分泌增加，诱使脉络膜出现新生血管并通过破坏了的 RPE 层进入视网膜下。新生血管管壁通透性高，导致局部渗出增加，并可出现黄斑部出血，形成湿性 AMD 病变，严重影响患者视力。另外一些患者没有新生血管生成，而是 RPE 层萎缩，继而视网膜神经上皮层萎缩，形成干性 AMD 病变（图 2）。

近年来，随着分子遗传学技术的进展，对 AMD 发病的认识发展到了分子水平。人类的常见疾病主要由一些常见遗传变异因子所致，例如有些人某个位点的编码核苷酸是腺嘌呤（A），而另外一些人可能是胸腺嘧啶（T），这被称为单核苷酸多态性，正是这些多态，使得人与人之间在长相、身高等方面存在着一定的差异，同时携带有某些多态位点的人更容易罹患某些疾病。随着人类基因组计划的完成和全基因组单核苷酸多态性扫描技术的成熟，人们可以比较方便地探讨 AMD 治病基因。此外，也有一些时候是由于基因出现了一些稀有突变所致，例如某个人编码某个视觉通路关键蛋白的基因发生了突变，进而出现 RPE 变性、AMD 病变，这种情况下需要进行全面测序才能发现这些未知的致病突变。学者

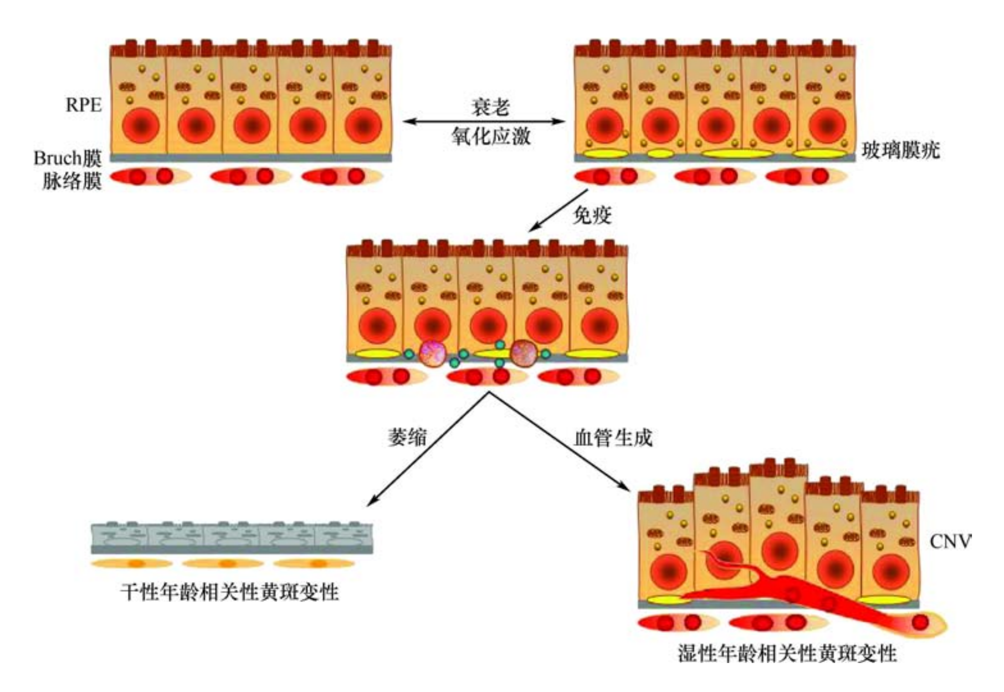


图 2　年龄相关性黄斑变性发病的病理生理机制

们已经发现补体因子 H 基因（CFH）、HTRA1、C2 和 C3 与 AMD 的各种表现型（包括早期的 AMD、干性 AMD 和湿性 AMD）相关，另有研究提示 TLR3 基因的突变很可能通过抑制 RPE 细胞的死亡来抑制干性 AMD。学者们进一步构建了这些基因增强与敲减动物模型，发现这些基因改变的确可以在动物眼内诱导出类似 AMD 的病变。近年的这些发现为阐明 AMD 发病机制提供了坚实的依据。但是，在人类，并不是有这些基因变异的个体就一定罹患 AMD。可见，AMD 发病机制是非常复杂的，很难用单一的机制进行解释。该病是多基因遗传病，是遗传背景下，由于环境因素（吸烟等）作用不断累积而发病的，因此主要发生于中老年人。

截至目前，国内外学者针对该病发病过程已经进行了大量研究，但目前仍有一系列与本病的发病机制相关的重要问题尚未得到解决。例如，已经发现了补体相关因子 H 与 AMD 发病相关，但是补体系统究竟是如何参与到 AMD 发病过程中的？为什么某些补体相关因子 H 的多态性改变导致了 AMD 发生，其分子机制是什么，这些多态性位点究竟导致了蛋白质分子结构和功能的哪些改变？在年轻时就进行这些基因位点筛查并进行基因干预，能否预防 AMD 的发生？Toll 样受体 3（TLR3）基因已经被证实与 AMD 发病密切相关，而 TLR3 是双链 RNA 受体，也可以认为是病毒受体，这是否能说明 AMD 发病与病毒感染相关？已经

发现TLR3基因与干性AMD相关，而与湿性AMD无关，这是否提示干性与湿性AMD存在不同的发病机制？该病研究的难点在于病变类型多样，发病过程复杂，多基因参与，环境因素也起到了很重要的作用。今后解决方向将根据分子遗传学提供的线索，通过分子生物学手段，探究该病的易感基因与环境因素，构建AMD动物模型，从而深入、全面地研究其发病机制。

总之，目前认为AMD是在遗传背景与环境因素共同作用下，衰老和氧化应激启动了病变，免疫的激活是联结早期病变与中晚期病变的关键桥梁，若血管生成因素占优势则发展为湿性AMD，凋亡因素占优势则发展为干性AMD。而实际发病过程中，以上这些因素并不是简单地先后叠加，而是共同作用，导致眼底出现AMD病变。但具体发病机制仍旧存在大量争议，仍有许多问题需要将来优秀的医学科学家们去解决。

参考文献

Altshuler D, Daly MJ, Lander ES. 2008. Genetic mapping in human disease. Science, 322: 881～888

Hollyfield JG, Bonilha VL, Rayborn ME, et al. 2008. Oxidative damage-induced inflammation initiates age-related macular degeneration. Nat Med, 14: 194～198

Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, et al. 2005. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. Science, 308: 385～389

Nussenblatt RB, Ferris F, 2007. Age-related macular degeneration and the immune response: implications for therapy. Am J Ophthalmol, 144: 618～626

Yang Z, Camp NJ, Sun H, et al. 2006. A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. Science, 314: 992～993

Yang Z, Stratton C, Francis PJ, et al. 2008. Toll-like receptor 3 and geographic atrophy in age-related macular degeneration. N Engl J Med, 359: 1456～1463

撰稿人：周　鹏　赵明威

北京大学人民医院

遗传性视网膜疾病的治疗

Treatment in Hereditary Retinal Disease

遗传性视网膜疾病（hereditary retinal disease，HRD）是由遗传基因变异导致的眼科临床上最常见且危害最严重的遗传性疾病，在欧洲和美国的发病率约为1/3000，主要包括视网膜色素变性、Leber先天性黑矇（Leber's congenital amaurosis，LCA）及视网膜劈裂症等。随着医学科学的发展，一些既往常见致盲眼病已成为可以预防或治疗的疾病，而HRD已成为国内外难治性眼盲的主要原因。由于HRD严重危害人类视觉健康，到目前为止还是一个“不治之症”，是眼科领域真正的“硬骨头”。如何治疗HRD患者，恢复视功能和提高生活质量已是我们将来面临的重大科学难题。

遗传性视网膜疾病是由基因突变导致的，筛查HRD致病基因成为治疗HRD的前提条件。从20世纪80年代开始，通过采用多聚酶链反应（PCR）及基因芯片等相关的分子生物学技术，到目前为止，虽然已经定位了202个与HRD相关的致病基因，其中160个已经被鉴定（图1），但仍然有一半以上的基因有待发现。由于HRD致病基因种类繁多，基因异质性和表型异质性都十分复杂。这些基因编码的蛋白质各自具有不同的功能，如参与光转换、参与视觉循环或作为感光细胞转录因子、组成光感受器结构等，但是还有相当多基因编码的蛋白质功能尚不明确。因此，一方面我们要努力发现更多的致病基因，另一方面还要继续深入研究这些致病基因的功能。

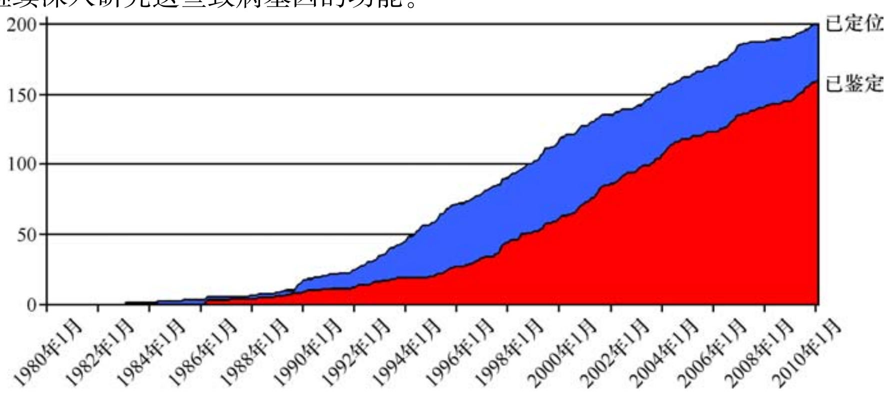


图1　1980～2010年国内外已定位和鉴定的遗传性视网膜疾病基因

目前针对 HRD 的治疗方法主要包括药物治疗、视网膜移植及人工视网膜的应用。然而，药物治疗仅仅是延缓视网膜变性的进展速度，不能恢复视功能，不能改变患者最终丧失视力的结局。而视网膜移植及人工视网膜治疗效果与预期相差甚远。所以针对其发病原因——突变基因的治疗才是 HRD 最根本的治疗方法。而近年来 LCA Ⅱ 型患者在基因治疗上取得突破性的重大进展，给其他 HRD 疾病的预防和治疗提供了新的方法。

在基因水平上对遗传疾病进行的治疗即基因治疗可能解决 HRD 的治疗难题。科学家把正常 RPE65 基因通过腺相关病毒载体（AAV）导入由 RPE65 基因突变所导致的先天失明犬和小鼠的视网膜细胞后，可以恢复动物的视功能。2009 年，Li 等在 rd12 小鼠上证实了视网膜下腔相对于玻璃体腔来说存在一个优势的免疫赦免区，更适宜于进行基因治疗，为未来选择基因治疗的部位提供了直接的理论依据。最近十年来取得了一系列重要进展，为 HRD 从“不治之症”逐渐过渡到“可治之症”奠定了坚实的基础。但将基因治疗应用于 HRD 的临床治疗还需要在以下方面进行深入研究：

选择基因治疗的时间点是基因治疗取得良好效果的关键所在。动物实验和临床研究表明，光感受器细胞死亡是通过凋亡在整个生命过程中以线性累加的方式进行的，这就意味着光感受器细胞凋亡从发病开始一直伴随到疾病晚期，提出了所谓的“治疗窗”，即进行治疗的最佳时机问题。解决“治疗窗”的关键是需要进行更多的临床试验来确定。

在眼科方面进行的基因治疗临床试验到目前为止只有两年左右的时间，因此长期疗效尚需进一步观察和评估。特别是由于晚期 HRD 患者只在黄斑部有少量锥细胞存活，因为视网膜的特殊结构，不可能进行反复多次的基因治疗，因此在一次基因治疗后恢复的视功能到底能够持续多久备受瞩目。解决的策略：一是根据“治疗窗”理论，尽量选择早期患者；二是根据光感受器变性的多元机制，探索将基因治疗和诱导的多潜能干细胞（iPS）移植等结合起来进行联合治疗的可能性；三是设计出转染效率更高、特异性更强的载体，即通过玻璃体腔注射就可转染到相应的组织细胞，而不必通过视网膜下腔注射，以便尽量减少对非常敏感的黄斑部特别是中心凹处残留锥细胞造成损害，从而影响视力提高。

21 世纪将是基因治疗取得重大突破和广泛应用的时代。由于视觉器官本身具有独特的组织结构优势，因此基因治疗首先将在眼科取得重大突破，眼科的突破点在 HRD！我国具有 56 个族群与众多的隔离族、近交系和大家系，有着丰富的 HRD 家系，是人类基因组多样性研究难得的珍贵资源。我们应充分利用这一优势资源，力争在 3～5 年内能够进行我国某些基因突变类型的 HRD 基因治疗Ⅰ期临床试验，在临床上真正开展 HRD 的基因治疗将从理想逐渐变为现实！

参 考 文 献

Acland GM, Hauswirth WW, Bennett J, et al. 2001. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. Nat Genet, 28(1): 92～95

Bainbridge JW, Smith AJ, Ali RR, et al. 2008. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. N Engl J Med, 358(21): 2231～2239

Bessant DA, Ali RR, Bhattacharya SS. 2001. Molecular genetics and prospects for therapy of the inherited retinal dystrophies. Curr Opin Genet Dev, 11(3): 307～316

Cideciyan AV, Hauswirth WW. 2008. Human gene therapy for RPE65-isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. Proc Natl Acad Sci USA, 105(39): 1512～1517

Li W, Kong F, Li X, et al. 2009. Gene therapy following subretinal AAV5 vector delivery is not affected by a previous intravitreal AAV5 vector administration in the partner eye. Mol Vis, 15(2): 267～275

Maguire AM, Simonelli F, Auricchio A, et al. 2008. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. N Engl J Med, 358(21): 2240～2248

Pang JJ, Hauswirth WW. 2006. Gene therapy restores vision-dependent behavior as well as retinal structure and function in a mouse model of RPE65 Leber congenital amaurosis. Mol Ther, 13(3): 565～572

撰稿人：李文生　郑钦象　陈国海

温州医学院附属眼视光医院

先天性白内障致病分子机制

Molecular Mechanisms of Congenial Cataract

先天性白内障指出生前即存在或出生后一年内形成的晶状体部分或全部混浊，是儿童常见的致盲性眼病，约占儿童失明原因的 10%。在世界范围内，先天性白内障患病率在（0.6～6）/10 000，且平均每年增加 2 万～4 万例。在我国，22%～30% 的盲童是由先天性白内障引起，占儿童失明原因的第二位；据最新数据显示，随着维生素 A 和麻疹免疫疗法的应用，小儿角膜疾病越来越少，先天性白内障越来越成为首位致盲性眼病。

先天性白内障临床表型各异，它可以单独发生，也可伴发其他眼部或全身发育异常。由于先天性白内障多在出生时或出生后早期发病，混浊的晶状体干扰了正常的视网膜刺激，引起视功能发育停滞从而导致严重的形觉剥夺性弱视，并且这种弱视不可逆转。在治疗上目前主要以手术治疗为主，但由于儿童眼部解剖的特殊性，手术反应较为剧烈，手术并发症多而严重，如术后后发性白内障发生率为 100%。另外，继发青光眼、葡萄膜炎及人工晶状体偏位等并发症的发生率也远高于成人，因此存在二次手术或多次手术的可能。可见，先天性白内障不仅严重危害患者健康，同时也给患者家庭及社会带来沉重的经济负担。因此，研究先天性白内障致病分子机制，将为先天性白内障的预防和治疗开辟新的途径，从而提高我国出生人口素质，减少先天性白内障的盲目率。

先天性白内障病因多而复杂，可分为遗传因素、环境因素和原因不明三类，其中遗传因素为最重要的因素之一，约占 50%，而具有遗传家族史者占 1/3。先天性遗传性白内障具有明显的临床和遗传异质性，即同一临床表型可源于不同的基因突变，而同一基因突变可引起不同的临床表型。正是由于这种高度的遗传异质性，使得基因型与临床表型间的关系尚不明确，白内障的致病机制仍未阐明。因此，采用多种遗传学研究策略进行先天性白内障相关基因的定位克隆及其功能研究，进一步阐明其发病分子机制，建立有效的诊断和防治措施，这将是各国科学家面临的科学难题。

过去数十年，国内外学者对先天性白内障家系已进行了广泛和深入的研究，并取得了重大进展。目前已发现与单纯先天性白内障相关的基因位点有 32 个，其中 22 个致病基因已被克隆（图 1），包括 10 个晶状体蛋白基因（CRYAA、CRYAB、CRYBA1/A3、CRYBA4、CRYBB1、CRYBB2、CRYBB3、CRYGC、

CRYGD、CRYGS），4 个膜蛋白基因（GJA3、GJA8、MIP、LIM2），3 个发育及转录因子基因（PIX3、MAF、HSF4），2 个细胞骨架蛋白基因（BSFP1、BSFP2），1 个染色质修饰蛋白-4B 基因（CHMP4B），1 个酪氨酸激酶受体基因（EPHA2），1 个 NHS 基因。其中，与常染色体显性遗传性白内障相关的基因有 18 个，与常染色体隐性遗传性白内障相关的有 7 个，与 X-连锁遗传性白内障相关的有 1 个。然而，先天性白内障种类较多，表型交叉重叠，基因型和表型之间的关系仍不确定，至今仍有多个位点未克隆出相关突变基因，因此收集临床资料完整的大家系进行全基因组扫描具有重要意义。另外，对于已鉴定的绝大多数突变如何导致白内障发生的分子机制仍缺乏了解。

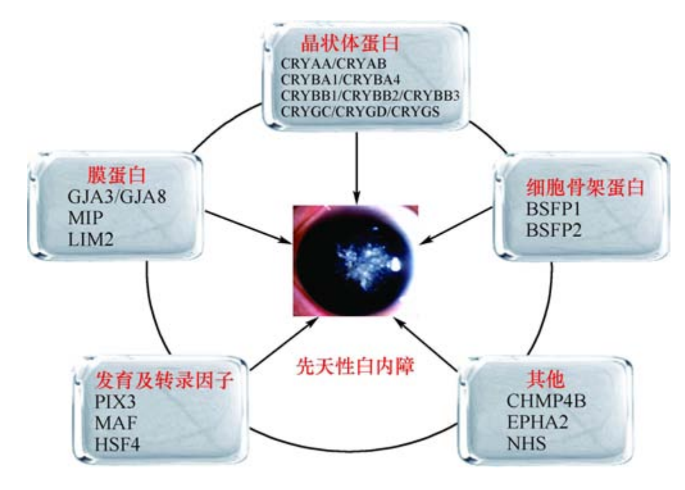


图 1　先天性白内障相关的致病基因

致病基因可单独致病，也可与其他基因交互作用共同促成白内障发生

解析基因突变的致病分子机制需要关注其对蛋白质分子结构、功能、稳定性等的影响。目前多倾向于将突变体基因体外表达并纯化，采用生物物理及生物化学方法检验蛋白质的结构、稳定性、聚集和纤维化能力的改变，并检验蛋白质功能是否受影响，可给予致病机制最直接的证据。利用细胞生物学技术研究突变蛋白在细胞内的分布以及分泌的蛋白聚集，是研究突变致病机制的另一途径，但是不能深入分析突变体分子构象的变化。在已发现致病基因突变中，约 50% 是由晶状体蛋白基因突变引起，并以晶状体蛋白基因突变的机制研究最为多见，目前认为蛋白质溶解性下降、分子伴侣活性丧失、细胞内定位改变和细胞凋亡等为晶状体蛋白基因突变的主要机制。

紫外线、氧自由基等是造成蛋白质稳定性下降的重要因素，这些因素可导致突变体蛋白发生不可逆性损伤，而野生型蛋白则具备针对这些损伤的保护能力，这可能是部分先天性白内障进行性发展的重要原因。因此，深入探究外界因素对

晶状体蛋白结构和功能的影响，有利于发现先天性疾患对后天外界环境的易感性，从而为遗传性疾病的防治提供指导或借鉴。

蛋白质错误折叠与疾病关系的研究是目前分子生物学领域的前沿课题之一，这将为先天性白内障致病机制研究带来一定的启发。具有完整氨基酸序列的多肽链，只有折叠形成正确的三维空间结构才能具有正常的生物学功能。一旦因某种原因发生了错误折叠，如基因突变，该蛋白质不仅将丧失其生物学功能，还会引起相关疾病。已有研究表明，先天性白内障的发生与蛋白质错误折叠和聚集有关，利用化学分子伴侣可以有效缓解蛋白质聚集和细胞凋亡，这将为先天性白内障的防治提供新的思路。

然而，先天性白内障表型复杂、致病基因种类繁多，不同的表达蛋白具有不同的生物学特性，很难用一种研究策略对所有基因突变进行阐释。另外，体外实验的结果不一定完全反映体内的真实情况，基于基因打靶技术建立基因敲入小鼠模型，对于研究单个基因突变的发病机制具有广阔的应用前景。

对于未来先天性白内障致病分子机制的研究，一方面有助于了解晶状体的发育生物学基础和先天性白内障的发病机制，同时也为老年性白内障的防治带来一定的启发。老年性白内障是世界首位致盲性眼病，虽然手术治疗较为成熟，但目前病因不明，通过对其进行分子遗传学研究，探索基因诊断和基因干预在老年性白内障防治中的应用，对于降低老年性白内障的盲目率、减少手术需求量及减轻其经济负担具有重要意义。

参考文献

王开杰，朱思泉，程杰. 2010.先天性白内障致病基因及其功能研究进展. 中华眼科杂志，46：280～284

Apple DJ，Ram J，Foster A，et al.2000. Elimination of cataract blindness：a global perspective entering the new millennium. Surv Ophthalmol，45：S1～196

Chen J，Callis PR，King J. 2009. Mechanism of the very efficient quenching of tryptophan fluorescence in human gamma d- and gamma s-crystallins：the gamma-crystallin fold may have evolved to protect tryptophan residues from ultraviolet photodamage. Biochemistry，48(17)：3708～3716

Francis PJ，Berry V，Bhattacharya SS，et al. 2000. The genetics of childhood cataract. J Med Genet，37(7)：481～488

Gong B，Zhang LY，Pang CP，et al. 2009. Trimethylamine N-oxide alleviates the severe aggregation and ER stress caused by G98R alphaA-crystallin. Mol Vis，15：2829～2840

Hejtmancik JF. 2008.Congenital cataracts and their molecular genetics. Semin Cell Dev Biol，19(2)：134～149

Maida JM，Mathers K，Alley CL. 2008. Pediatric ophthalmology in the developing world. Curr

Opin Ophthalmol,19(5):403～408

Pehere NK, Chandrasekhar G, Kekunnaya R. 2009. The critical period for surgical treatment of dense congenital bilateral cataracts. J AAPOS,13(5):527～528

Reddy MA, Francis PJ, Berry V,et al. 2004. Molecular genetic basis of inherited cataract and associated phenotypes. Surv Ophthalmol,49(3):300～315

撰稿人:朱思泉　王开杰

首都医科大学附属北京同仁医院

青少年近视发病机制

The Mechanism of Myopia

青少年近视特指学龄期发生、发展，进展速度低于每年 1.0D，有一定的自限性，最终近视度为中低度的近视，是近视群体中的常见类型。这部分近视，以远视力下降为主要临床表现，矫正视力正常，生活质量受影响轻微，属于单纯性屈光不正。这种屈光不正发生率在不同人种有明显差异。在西方国家，近视患病率为 13%～28%；而在一些亚洲地区，如中国香港、中国台湾、新加坡则高达 71%～96%。近视矫正带来了巨大的社会健康负担，尤其是在发展中国家。造成近视的原因有很多，各类研究主要关注的是遗传因素、生活方式改变、环境的变迁等。

1. 遗传因素

随着现代遗传学和分子生物学技术在眼科学研究中的日益广泛使用，近视相关的基因和分子物质的研究取得了可喜的成果。单卵孪生家庭研究发现，近视形成过程中，遗传因素起 75%～94% 的作用，而在非单卵孪生家庭，遗传作用只占 27%～55%。若把近视看做是由遗传和环境两个因素所决定的，Hammond 等认为遗传因素占 90%，Teikari 等认为遗传因素占 58%。对于青少年近视，遗传因素占 80%。使用不同遗传研究方法，如家族性相关分析、家族性混合分析及家族性分离分析，均显示了相似的遗传学意义。

人眼的屈光状态由众多因素共同决定，比如眼轴长、前房深度、角膜曲率及晶状体厚度。其中眼轴长度是最主要的决定因素，而眼轴长度 40%～94% 由遗传决定。利用全基因组配对研究首次发现了关于眼轴长度的基因座，位于 5 号染色体长臂上，同时还证实了一些附加区域与眼轴长度相关，分别位于 6 号、10 号、14 号染色体上。但是没有发现与前房深度、角膜曲率或晶状体厚度相关的基因位点。

2. 基因位点

MYP1 位点是第一个于 1990 年被证实的 X 连锁基因位点（Xq28），后来又发现 MYP13。在 5 个高度近视的家系研究中发现，候选基因 TEX28 的拷贝数不是 3，而是 2 或者 4 或者 5，这种拷贝数的变异现象也许是近视发病的一个遗传易感因素。进一步研究发现，近视的 X 连锁基因位点可能有较强的种群或种族特异性。常染色体位点有 MYP2～MYP12、MYP14，除此之外，研究发现了位于 5 号染色体短臂上的常染色体显性遗传基因位点（5p15.33—p15.2）；在美国

黑人中首次发现了眼屈光的数量性状基因位点，位于 7 号染色体短臂上（7p15）；通过对有血缘关系的亲属进行临床和基因连锁研究，首次发现常染色体隐性遗传的高度近视相关基因位点，位于第 14 号染色体长臂（14q22.1—q24.2）上。早先发现的基因位点再次被其他研究者复制证实，如第二个被发现的常染色体显性遗传高度近视相关基因位点 MYP3（12q21—q23，OMIM 603221）就在一个中国香港的人群队列研究中被复制出来。在一个大规模的、以 254 个家族为研究对象的家族性高度近视的基因连锁扫描研究中演示了 MYP1、MYP3、MYP6、MYP11、MYP12 和 MYP14 基因位点的连锁复制，并证实了一个新的基因位点（9q34.11）。

3. 候选基因

小富含亮氨酸重复蛋白聚糖、Nyctalopin、TGIF、肝细胞生长因子 HGF、肌纤蛋白、胶原蛋白基因、PAX6 是近视研究的热门候选基因，此外，基质金属蛋白酶（MMP）毫无疑问涉及巩膜细胞外基质的重塑过程，推荐为近视的候选基因。研究发现 2 种线粒体相关基因与近视发病相关，分别是 MFN1 和 PSARL，意味着线粒体分子途径在近视的发展中扮演着一定的角色，出乎人们的意料。有研究者公布了关于 UMODL1 基因与近视相关的数据。该基因编码的蛋白质为分泌蛋白，与细胞外基质蛋白相关，功能涉及细胞与细胞、细胞与细胞外基质的黏附及细胞迁移。暗示着许多辅助因子在高度近视发展过程中也扮演着自己的角色。

4. 动物模型

在人眼近视研究中，要想将相关的基因型数据与眼的组织病理学联系起来，存在着巨大的障碍，即我们无法将感兴趣的眼组织单独取样出来。因此，虽然我们并不知道动物的近视发展机制与人眼的近视病理机制有怎样的联系，动物的近视模型理所当然地成了人眼的替代品。过去 30 多年，对幼年及新生猴子、树鼩、小鸡模型的研究，揭示了眼睛正视化的动态机制，即眼球轴长与眼屈光力始终保持匹配，使得光感受器总是在物像的焦点上。这过程包括在视网膜、视网膜色素上皮层、脉络膜及巩膜上表达的基因对正视化过程的调控，如果表达失控，则导致眼球异常增长，形成近视。

动物模型研究证实，巩膜的病理改变是近视发生的重要机制，巩膜成纤维细胞分泌胶原等细胞外基质成分，共同构成眼球外壁，维持眼球组织的完整并决定了眼轴的长度。形态学研究发现，其巩膜纤维层变薄，后极部巩膜胶原、蛋白多糖等含量明显减少，胶原纤维有超微结构的变化，而在近视恢复期，可观察到相反的改变。研究者由此提出近视发生的视网膜调控学说：由视网膜产生的某些生物活性物质，作用于巩膜成纤维细胞，是导致巩膜重新塑形、眼轴延长的原因。推测视网膜- 色素上皮- 脉络膜机制可能是通过多种多级神经递质的相互作用而

完成的，如阿托品、多巴胺、血管活性肠肽、视黄醛、一氧化氮、褪黑素、胰高血糖等一级信使，碱性成纤维细胞生长因子、转化生长因子和基质金属蛋白酶等二级信使，最终作用于巩膜。但是，实验性近视研究动物生长环境、用眼习性与人类差异太大，到目前为止，几乎所有成果还未转化为防治技术。

5. 环境因素

人眼的调节功能在正视化过程中是一个非常重要的视觉信号。随着人体的发育，晶状体会逐渐变薄、延展，该过程被扰乱是近视发展的一个重要环节。睫状肌在人眼正视化及近视发展过程中扮演着比我们先前想象的更为重要的角色。与近距离工作相比，户外活动可能是影响近视发展更重要的一个环境因素，它与遗传因素之间有着重要的相互作用，成为近视发展的危险因素。

尽管大量动物实验表明，远视的离焦状态会刺激眼球发育，眼轴延长，从而防止远视的发生。婴儿正视化观察显示，调节反应能力是眼睛正视化最重要的视觉信号，而非远视离焦。两种理论孰是孰非，有待更进一步的研究证实。那么调节反应是怎样影响眼球的发育的呢？一种可能的机制就是调节反应影响睫状肌，从而使眼球变长，阻止其向远视发展。因此，睫状肌在人眼正视化、近视化及远视化过程中都扮演着重要的角色，但其确切机制迄今为止仍未知，有待大量的动物及人眼正视化研究来阐明。

研究发现，随着电脑视屏、电视机、各种电灯为代表的人造光源使用越来越广泛，可以发现，人类对人造光源的依赖程度、夜间工作活动时间的延长与近视增加的趋势极为吻合。目前，两岁以下的婴幼儿生活环境光源的流行病数据极为缺乏，可能成为近视流行病研究的新热点。

目前预防或延缓近视的方法主要有光学矫正和药物治疗。光学矫正基于调节学说，其形式包括双焦眼镜、多焦眼镜、在近距离工作时摘掉视远眼镜、硬性角膜接触镜，研究表明，没有证据显示光学矫正能够预防近视的发生及进展。睫状肌麻痹滴眼剂如阿托品滴眼剂能延缓学龄期儿童的近视眼进展，但是药物引起瞳孔散大增加光对视网膜损害，以及怕光、眼表毒性、眼部过敏、停药后的近视快速进展，这些因素限制了其在临床广泛应用。

在已有的研究基础上，可以看到遗传因素为近视发生提供可能性，环境因素是决定近视发生发展的决定性因素。非常重要的问题是，近视发生的过程是渐进的累积过程。用眼的过程伴随着近视的发生。作为近视人群中比例最大的、介于正常和病理性改变之间的青少年近视，逐步明确遗传与环境的共同作用机制，阐明其发生发展过程，是预防近视甚至治疗近视的理论基础。预防近视的目的完全有可能通过对环境和用眼方式的优化来实现。

参 考 文 献

胡诞宁.2004.近视的病因与发病机制研究进展.眼视光学杂志,6(1):1～5

汪芳润.2003.近视眼研究现状与存在的问题.中华眼科杂志,39(6):381～384

Hornbeak DM, Young TL.2009.Myopia genetics: a review of current research and emerging trends. Curr Opin Ophthalmol,20(5):356～362

Jacobi FK, Pusch CM. 2010. A decade in search of myopia genes.Front Biosci,15:359～372

Jones LA,Sinnott LT, Mutti DO,et al. 2007.Parental history of myopia, sports and outdoor activities, and future myopia.Invest Ophthalmol Vis Sci,48:3524～3532

Morgan I,Rose K. 2005.How genetic is school myopia? Progress in Retinal and Eye Research, (24):1～38

Mutti DO.2010. Hereditary and environmental contributions to emmetropization and myopia. Optom Vis Sci,87(4):255～259

Saw SM, Zhang MZ, Hong RZ,et al. 2002. Near-work activity, night-lights, and myopia in the Singapore-China study. Arch Ophthalmol,120(5):620～627

撰稿人:沈 晔

浙江大学医学院附属第一医院

怎样的血管神经压迫会导致三叉神经痛

What Kind of Neurovascular Compression Will Give Rise to Trigeminal Neuralgia

早在 1934 年 Dandy 就在行颅内三叉神经根切断术时发现了血管对三叉神经的压迫，并认为在病理学上起重要作用。20 世纪 70 年代以后，随着 MRI 检查的确认和微血管减压术报道的显著疗效，神经血管压迫被日趋公认为是三叉神经痛的主要发病原因（图 1），71%～94% 的三叉神经痛患者存在此发病基础。

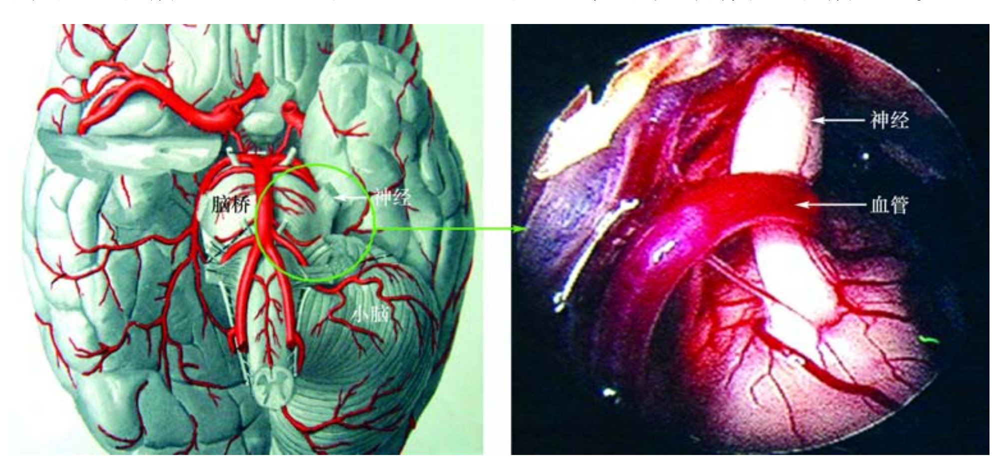


图 1　三叉神经痛的微血管减压术中发现的脑桥小脑角血管对三叉神经的压迫

该病因假说面临的一大质疑是正常人群中亦有 38% 左右存在类似的神经血管压迫现象。为什么同样的神经血管压迫会得到截然相反的结果？是慢性压力还是慢性牵张的作用？其作用达到什么程度引起神经发生何种微观变化才能诱发三叉神经痛？寻找血管压迫学说的神经病理生理学本质是目前一大难题，缺乏相应的动物模型是一大障碍，而目前对于神经病理生理研究过于局限，近乎“盲人摸象”。

对于血管压迫的病理机制多数学者认为是压迫引起了神经的脱髓鞘反应，并通过四种方式造成神经过度兴奋：①传入、传出神经“短路”；②神经双向传导；③传导速度降低，中枢产生“总和”；④异常突触形成，其他感觉信号的变化通过异常突触引起痛觉递质的变化，使其他感觉如压觉、温度觉、肌梭本体感觉等

传至中枢均引起痛觉。支持此观点的学者的依据有两点：一是早期行神经根切断术时取下的病理标本显示神经根的脱髓鞘反应；二是多发性硬化症患者存在脱髓鞘病变，部分该类患者合并三叉神经痛。质疑此论点的学者认为有髓鞘的感觉神经轴索的活性与触觉和振动觉相关，而非痛觉；而且自身脱髓鞘只阻断了脉冲式的传导，只可能引起麻木而非阵发性疼痛，这与三叉神经痛患者发作间歇期往往存在感觉减弱相关，不能解释痛觉的发生机制。即便“短路”、“总和”的理论存在，也无法解释疼痛为何存在间歇期以及为何疼痛的强度与刺激强度无关。

但在捕捉这些机制的神经病理生理学表现上众说纷纭，大多集中在膜通道蛋白和神经递质的异常，而此类发现也多数来源于脊髓背根神经节的实验研究。膜通道蛋白的研究是一种基于电生理学的研究。脱髓鞘、神经轴索末梢卷曲和轴索出芽都可能导致膜通道蛋白的易位和过度表达，从而引起自发的、持续的冲动产生，被称为“后发放”，此种电生理冲动可通过正反馈经相邻神经元的结合点（电压敏感的膜通道）传导并扩布，类似于共振，产生阵发性的疼痛。前一种膜通道蛋白被称为一种“点火装置”，后一种电压敏感的膜通道称为“燃料”。在膜通道蛋白研究中，发现钠离子通道 Nav1.7、Nav1.3 和 Nav1.8 的高表达是疼痛发作的基础，而 Ca^{2+}-K^{+} 通道的开放使 Ca^{2+} 流入神经元、K^{+} 离子流出神经元是疼痛缓解的基础。

另一种共振的机制源于化学性信号的转导，特别是神经元内神经递质和钾离子。这些化学信号以扩散的方式移动到神经元间质中，刺激邻近神经元放电。在神经递质方面，5-羟色胺、白介素-6、磷酸二酯酶（PDE）、神经肽 Y 等都表现出了升高的趋势。

通道和递质是三叉神经痛病因学中共同存在、相互影响的两个方面，孤立地研究不能彻底解释病因，寻找超微结构和神经递质的一系列相互关系是研究的主要方向。任何一种机制都需要解释三大问题：①扳机点的轻微刺激如何诱发一次持续时间长于刺激时间的疼痛；②局限的、非伤害性的刺激如何引起弥散的、剧烈的疼痛；③是什么导致一次发作的暂时性停顿。

神经病理性疼痛的动物模型建立以大鼠为主，主要分为缺血性损伤、化学损伤和窄缩性机械损伤两种。对三叉神经痛动物模型的建立，曾有学者借鉴坐骨神经痛的研究，于三叉神经外周部分入手，如眶下神经的慢性缩窄实验诱发大鼠神经病理性的触觉过敏、热过敏或冷过敏，以大鼠的行为表现或电生理变化诊断神经病理性疼痛，但此类神经痛更适宜反映神经损伤性疼痛，一些痛觉过敏的表现不能代表三叉神经痛的症状。Ahn 等半月神经节的模拟实验使得致病因素将实验向中枢进一步推进，其一是将溶血磷脂酸 LAP 注射于半月神经节使其脱髓鞘，以诱发神经痛；另一部分是慢性压迫实验，他们将加热的琼脂液通过注射器由前囟侧方注入半月神经节，琼脂液凝固后产生压力，其方法提供了一个建立三叉神

经痛的新思路。将微小气囊插于脑桥小脑角的三叉神经根旁，控制一定的压力和搏动，以模拟血管神经压迫模型可能是建立三叉神经痛模型的另一方法。

参 考 文 献

Ahn DK, Lee SY, Han SR, et al. 2009. Intratrigeminal ganglionic injection of LPA causes neuropathic pain-like behavior and demyelination in rats. Pain, 46: 114～120

Ahn DK, Lim EJ, Kim BC, et al. 2009. Compression of the trigeminal ganglion produces prolonged nociceptive behavior in rats. Eur J Pain, 13: 568～575

Chen MJ, Zhang WJ, Yang C, et al. 2008. Endoscopic neurovascular perspective in microvascular decompression of trigeminal neuralgia. J Cranio-Maxillofac Surg, 36: 456～461

Chudler EH, Anderson LC. 2002. Behavioral and electrophysiological consequences of deafferentation following chronic constriction of the infraorbital nerve in adult rats. Arch Oral Biol, 47: 165～172

Fukuda H, Ishikawa M, Okumura R. 2003. Demonstration of neurovascular compression in trigeminal neuralgia and hemifacial spasm with magnetic resonance imaging: comparison with surgical findings in 60 consecutive cases. Surg Neurol, 59(2): 93～99

Jarrahy R, Berci G, Shahinian HK. 2000. Endoscope-assisted microvascular decompression of the trigeminal nerve. Otolaryngol Head Neck Surg, 123: 218～223

Patel NK, Aquilina K, Clarke Y, et al. 2003. How accurate is magnetic resonance angiography in predicting neurovascular compression in patients with trigeminal neuralgia? A prospective, single-blinded comparative study. Br J Neurosurg, 17(1): 60～64

Siqueira SR, Alves B, Malpartida MJ, et al. 2009. Abnormal expression of voltage-gated sodium channels Nav1.7, Nav1.3 and Nav1.8 in trigeminal neuralgia. Neurosci, 164: 573～577

撰稿人：张志愿　陈敏洁
上海交通大学医学院附属第九人民医院

如何减小先天性颅颌面畸形的治疗难度

How to Control the Complicated Treatment for
Congenital Craniomaxillofacial Abnormality

先天性颅颌面畸形患者，其丑陋的颜面外貌和伴发智力的发育障碍给社会和家庭带来严重的负担。

颅颌面畸形包括以颅缝早闭症、面裂等为主的颅面畸形，以及以颌骨异常、唇腭裂等为主的颌面畸形。Myrinthopoulos（1977）从一组 53 257 名孕妇中查出，颅面畸形的发生率为 1∶1900。Hunter 及 Redd（1976）在加拿大多伦多儿童医院记录中查到，在 1 809 574 名新生儿中有 370 例各种类型的颅面畸形，发生率为 1∶2450。澳大利亚 David 的调查发现，1961～1975 年，在 17 000 名新生儿中，发现有 79 例患有各种颅面畸形，发生率为 1∶4000。如果将唇腭裂等颌面部畸形也计算入内，先天性颅颌面畸形的整体发病率甚至超过 1∶900。我国是人口大国，但目前尚缺乏完整的发病率统计资料，可以想见的是，颅颌面畸形总数十分惊人。

1. 如何尽早发现畸形

大医治于未病。基因方面的研究可以提示先天性颅颌面畸形的确切病因，并为未来基因水平的治疗提供基础。目前国内外在畸形的基因发生方面进行了许多研究，虽有些进展，但所知甚少。研究发现，与颅缝早闭症相关的突变基因已明确有 11 个，常见的如成纤维细胞生长因子受体（FGFR1、FGFR2、FGFR3）、转化生长因子 β 受体（TGFBR1、TGFBR2）等；Crouzon 病的基因突变位点在 FGFR2（细胞外区）＋/C278F、＋/C342Y、＋/S347C。但现对于临床上多种颅颌面畸形病因学研究，尤其是基因研究，仍是重点。

2. 如何控制畸形的发生、发展

有些畸形的发生、发展和患者的年龄、发育等因素有关。如颅缝早闭症，应在 1 岁以内手术干预，行颅骨改建和扩大手术，既改善颅貌，又减少颅内高压症，进而改善智力发育环境；半侧颜面短小症，需在 8～10 岁进行手术或牵引成骨治疗，以防成年后更为严重的颜面歪斜和咬合错乱。如何在患者发育过程中，控制和减少畸形的危害，是未来临床研究的主要内容。

3. 如何减少手术矫正严重颅颌面畸形的难度

传统颅颌面复合截骨手术，出血多、风险大、有一定的并发症，而且手术难

度很大，全世界也仅有少数出色的医生能够全面掌握此类手术治疗手段。近年来，采用微创手术，辅以其他手段如牵引成骨、塑形支局等矫正严重的颅颌面畸形，已成为临床研究的热点，并已取得一定的成果。然而，如何进一步减少手术创伤、缩短手术时间、更好地维持手术效果、达到更精确的手术目的（计算机辅助技术）等，仍然是未来临床治疗的主要研究内容。

4. 如何进行手术治疗后的身心康复，帮助畸形患者成长为正常的社会成员

通过各种现代化的医疗手段及多学科团队合作模式改善患者的容貌、重建患者的功能，打断患者生理-心理-社会三环节交互影响恶化的循环，为患者的全面恢复奠定基础。广泛的心理干预、社会护理等工作需要在越来越多的领域介入患者的治疗过程。

先天性颅颌面畸形，通常需要多次重大手术，此类患者的治疗需要广泛的社会和国家资源的投入。如何构建临床医学中心-基础研究中心-基金管理机构三位一体的颅颌面畸形治疗机构，为颅颌面畸形的治疗提供全面的支持，是我国目前相当艰巨的工作。

参考文献

Eswarakumar VP, Horowitz MC, Locklin R, et al. 2004. A gain-of-function mutation of Fgfr2c demonstrates the roles of this receptor variant in osteogenesis. Proc Natl Acad Sci USA, 101: 12555～12560

Hajihossein MK, Wilson S, De Moerlooze, et al. 2001. A splicing switch and gain-of-function mutation in FgfR2-IIIc hemizygotes causes Apert/Pfeiffer-syndrome-like phenotypes. Proc Natl Acad Sci USA, 98: 2855～3860

Wang Y, Xiao R, Yang F, et al. 2005. Abnormalities in cartilage and bone development in the Apert syndrome FGFR2(+/S252W) mouse. Development, 132(15): 3537～3548

Wilkie AO. 1997. Craniosynostosis: genes and mechanisms. Hum Mol Genet, 6(10): 1647～1656

撰稿人：穆雄铮

上海交通大学医学院附属第九人民医院

口腔黏膜癌前病变的恶变机制

Mechanisms of Malignant Transformation for Oral Premalignancy

肿瘤是严重威胁人类生命和影响生活质量的疾病，其预防和治疗至今仍是一个未攻克的难题。人们很早就想到，是否有办法在疾病尚未发生时就将其“消灭在萌芽状态”？这就是古训“上工治未病”的思想所在。现代肿瘤学研究证实，肿瘤的出现是一个由渐变到突变的过程，即普遍存在“癌前病变”或“癌前状态”阶段，为肿瘤治疗的战略重点由“癌后”转移到“癌前”提供了依据。

已有大量临床证据和动物模型证明，占口腔癌绝大多数的鳞癌有“正常黏膜上皮—异常增生上皮—原位癌”的规律性变化过程，其中黏膜上皮异常增生是公认的“癌前病变”阶段。所以，对黏膜癌前病变恶变机制的全面认知和阻断甚至逆转进程的“源头性”有效防治，已列入世界卫生组织（WHO）2000 年公布的“新千年世界口腔卫生新目标”中。它既是遏制近年来口腔癌上升势头的希望所在，也是一个医学科学的难题。

口腔黏膜癌前病变防治的最大难点在于对口腔黏膜癌前病变的始动因子和机制尚不清楚。就目前的研究手段来看，临床流行病学调查是从群体角度寻找癌前病变始动因子的有效工具。根据 WHO 对癌前病变的定义及疾病名单，我国于 1978 年在全国范围内开展了较大规模的“两病”流行病学调查（口腔白斑oral leukoplakia，OLK 见图 1；口腔扁平苔藓 oral lichen planus，OLP，见图 2），这是迄今我国口腔癌前病变特定病种全国范围的唯一调查。

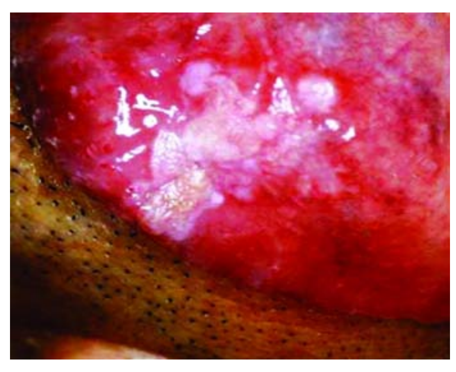
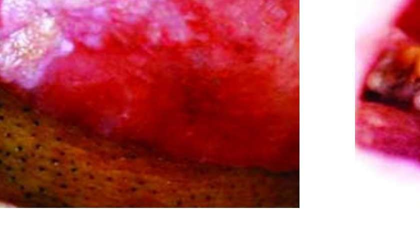


图 1　OLK



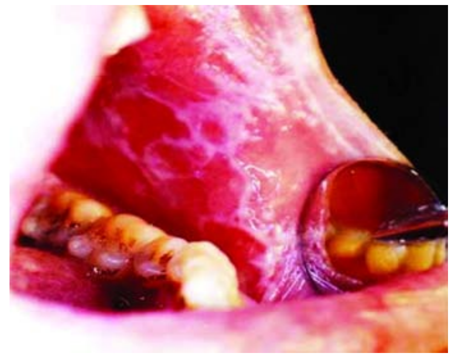


图 2　OLP

调查结果显示，OLK 患病率为 1.27% ～17.28%，癌变率为 6% ～36%；OLP 患病率为 0.51%，癌变率为 1% ～10%。归结出烟草刺激是口腔黏膜癌前病变的始动因子；性别、病原微生物侵犯、病损部位是癌变高危因素等。2005～2007 年国家卫生部委托全国牙病防治组做了“第三次全国口腔健康流行病学调查”，对 93 826 人的大样本调查显示，OLK 和 OLP 发病率居高不下与同期“烟民”、“酒民”比例同步上升有关。尽管临床流行病学调查发现了一些迹象，遗憾的是，目前国内外流行病学专题研究口腔癌前病变的报道很少，样本量普遍偏小，调查范围局限，加上对口腔癌前病变定义理解的不同，致使不同国家、不同样本的调查结果差异很大，很难对口腔黏膜癌前病变的始动因子和癌变的高危因素得出全面和权威的结论。

在探索口腔黏膜癌前病变机制方面，分子生物学有其特殊的作用，能够说明口腔黏膜的基因、蛋白质、细胞因子等微观层面变化与癌变的关系，例如已经发现，EDFR 及其调节基因 C-erbB-1，LOH 或等位基因的不平衡，p53 抑癌基因的突变，Bax 的蛋白质表达下降，端粒酶异常，异常的 DNA 分裂象，增殖细胞核抗原、FHIT、ATM、Fas、FasL、CD44V6、内皮素 1、p16、bcl-2、p21WAF1 等基因表达以及表观遗传学证明基因的异常甲基化可能与口腔癌前病变恶变有关。虽然已经利用分子生物学发现了不少信息，但仍然没能对口腔黏膜癌前病变机制得出明确的整体概念。与其他学科相比，口腔癌前病变研究更是局限于跟在其他学科肿瘤之后的“拷贝式”、“零碎化”研究，缺乏口腔特异性。

由于口腔黏膜癌前病变机制不清，派生出的难点就是如何准确诊断和采取什么防治措施。因为口腔癌前病变缺乏统一的定义，所以制定一致的诊断标准很难。以 OLK 为例，自从匈牙利皮肤病专家 Erno Schwimmer 于 1877 年首次提出白斑一词以来，较为统一的标准直至 1978 年才由 WHO 口腔癌前病变协作中心制定出来，但因不够全面，又于 1996 年由一组致力于口腔白色损害研究的国际流行病学家、临床学家及病理学家，在瑞典会议上对 OLK 定义再次进行讨论和修订，统一为“口腔黏膜上以白色为主的损害，不具有其他任何可定义的损害特征；一些口腔白斑可转化癌”。并据此制定了包括临时性诊断（provisional diagnosis）和肯定性诊断（definitive diagnosis）在内的诊断标准体系。尽管如此，实施这一诊断标准仍然有许多方法学上的困难。目前对口腔黏膜癌前病变的诊断方法包括了分子标志物、甲苯胺蓝染色、脱落细胞学检查、唾液分析等，但均不够成熟，诊断可信度不高。组织病理学检查仍然是当今口腔癌前病变最有效和最权威的诊断手段和金标准，但因病理医师的主观性、病损组织标本的异质性，都会带来诊断偏差；同时因黏膜恶变始于基因改变，组织病理学对细胞形态的观察优势发现不了分子水平的改变，因而不可避免地影响到预测的准确性；此外，活检的创伤性使患者依从性大打折扣，因此活体组织检查也不是理想的诊断方法，

其对恶性潜能的诊断准确性值得怀疑。

机制和诊断的困难必然使口腔黏膜癌前病变的防治环节和靶点处于不清晰的状态，目前对此仍缺乏有效的控制手段和经典的治疗方案。尽管学界已经做了巨大努力，尝试了包括药物、理疗、手术、基因治疗等多种方法在内的治疗措施，但疗效均不确切。例如激光、冷冻、微波治疗 OLK 均有报道，但复发率高达20%～40%，而且一旦技术参数掌握有偏差，反而可能促进癌变。迄今，药物治疗仍是癌前病变的主要治疗手段，但经典的维 A 酸类药物疗法又缺乏安全性。而生物疗法效率不高，可行性差。学术界对形态学表现正常或者轻度异常增生的病例是否适合手术治疗有很大的争论。由于口腔黏膜癌前病变的治疗受到区域癌化因素的影响，无论是药物治疗还是外科手术治疗，其疗效多具有不确定性，这就使医者处于茫然的境地。

解决上述问题必须选择口腔黏膜癌前病变中的典型病种——口腔白斑为突破口，依照国际标准组织针对口腔白斑的专题性全国范围临床流行病学调查，从宏观层面提供预防环节。并且要采纳系统生物学的理念，组织系统性的口腔黏膜癌前病变基础研究，从微观层面提供治疗的干预靶点。在诊断方法学方面要充分重视分子标志物对癌前病损恶变潜能的预测作用，以信息技术为支撑，采用模糊数学、网络分析等聚焦手段，提高对大量分子标志信息的综合处理能力，结合传统的组织病理方法，提高诊断和癌变预警的准确性。同时要着重研究人类唾液作为检测样本的可行性，取得符合“简便、快速、安全、无创”要求的诊断手段。在治疗上一方面要采用口腔循证医学方法，从众多以往临床研究中找出相对有效的临床方案，以解燃眉之急。另一方面要重视转换医学研究，缩短癌变机制研究成果与临床应用之间的转化路径，并从近年学术界提出的“癌化学预防”概念出发，重点研究开发“高效、无毒、口服、廉价”的癌化学预防药物，其中中医药学具有得天独厚的优势。因此，依托中医药现代化的进程，加强中医药有效成分的研究和临床应用，有望成为提高口腔黏膜癌前病变疗效的主要手段之一。

口腔癌因“抛头露面”的解剖位置决定了其特殊性，对容貌、语言、咀嚼、吞咽的影响会严重妨碍患者社交和尊严，使其受到身体和心理的双重折磨。同时，口腔黏膜的可视性，又可为全身癌前病变的防治研究提供窗口，因此这一难题的提出和解决具有特殊的科学意义。

参考文献

李金荣，何荣根．2002．口腔颌面部肿瘤基础研究新进展．武汉：湖北科学技术出版社，3～55

齐小秋．2008．第三次全国口腔健康流行病学调查报告．北京：人民卫生出版社，84，104，155，177

史宗道．2003．循证口腔医学．北京：人民卫生出版社，173～177

汤钊猷. 2000.现代肿瘤学.上海:上海医科大学出版社,339～555
许国祺,李秉琦,李辉奉. 1992.口腔癌前病变——白斑与扁平苔藓.北京:中国医药科技出版社,1～8,129～140
Poul Erik Petersen. 2004. 21世纪继续提高人类口腔健康水平(世界卫生组织全球口腔卫生策略).中华口腔医学杂志,39(6):441～444
Cao J, Zhou J, Gao Y, et al. 2009. Methylation of p16 CpG Island associated with malignant progression of oral epithelial dysplasia: a prospective cohort study. Clin Cancer Res, 15(16): 5178～5183
Holmstrup P, Vedtofe P, Reibel J, et al. 2007. Oral premalignant lesions: is a biopsy reliable. Oral Pathol Med, 36(5): 262～266
Seitz SJ, Schlethoff ES, Koch A, et al. 2010. Chemotherap-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma involves the p53 family and is mediated via the extrinsic and the intrinsic pathway. Int J Cancer, 126: 2049～2066
Zhou ZT, Yang Y, Ge JP. 2006. The preventive effect of salvianolic acid B on malignant transformation of DMBA-induced oral premalignant lesion in hamsters. Carcinogenesis, 27(4): 826～832

撰稿人:周曾同
上海交通大学医学院附属第九人民医院

各种医学影像信息的融合

Multimodality Medical Image Fusion

医学影像根据其所提供的信息内涵，可分为两大类：解剖影像和功能影像。解剖影像主要描述人体形态信息，包括X线成像、计算机体层摄影（computed tomography，CT）、磁共振成像（magnetic resonance imaging，MRI）和B超等；功能影像主要描述人体代谢信息，包括正电子发射计算机断层显像（positron emission tomography，PET）、单光子发射计算机断层显像（single photon emission computed tomography，SPECT）、功能性磁共振成像（functional MRI，fMRI）等。这两类影像各有其优、缺点：解剖影像以高分辨率提供了脏器的解剖形态信息，但无法反映脏器的功能情况；功能影像分辨率较差，但它能提供脏器的功能代谢信息。如果我们能把它们的互补信息综合在一起作为一个整体来表达，那么就能为医学诊断、人体功能和结构的研究提供更充分的信息。

已有研究表明PET/CT的融合图像在显示肿瘤的轮廓、侵犯范围及淋巴结的早期转移方面，都要优于单独的PET或CT、MRI检查，因为病变组织的新陈代谢变化早于形态学的改变。原发癫痫病灶的影像学定位一直是个大难题，目前的研究发现于癫痫的发作期和发作间期，对患者分别进行SPECT检查，然后将二者的图像相减，再与MRI图像融合，则可以利用SPECT的脑血流变化的信息在MRI图像上对癫痫灶进行准确的解剖定位，为立体定向外科手术提供重要依据。医学影像融合就是指将不同成像设备获得的对于某一特定结构的多种影像信息整合在同一影像上进行显示的影像处理技术，其意义在于综合整体信息大于各部分信息之和。

目前影像融合可分为异机融合和同机融合两大类型，从技术上来将，前者主要依赖于图像的信息提取和后处理技术，而后者更依赖于成像设备的整合。

1. 异机影像融合

在同机融合设备没有出现以前，影像融合的研究仅限于异机融合。异机影像融合的基本方法按融合对象的来源可分为同类影像融合（intra-modality），如MRI的T_1加权图像（T_1 weighted image，T_1WI）和弥散加权成像（diffusion tensor imaging，DTI）图像之间，CT的常规扫描和血管成像图像之间等，以及异类影像融合（inter-modality），如SPECT和CT、PET和MRI、MRI和B超等。

异机影像融合的主要技术大致可分为图像特征提取、图像配准和融合图像的综合显示，其中配准技术是影像融合的关键。

异机图像融合目前存在的问题和难点主要包括：

（1）由于各种成像系统的成像原理不同，其影像采集方式、格式，以及图像的大小、质量、空间与时间特性都有很大差别，因此研究稳定且精度较高的全自动医学图像配准与融合方法是图像融合的难点之一。

（2）目前对于非刚性组织（如腹部）的配准和涉及软组织变形或位移的图像配准方法较少，大部分还处于实验研究和有效性验证状态。在神经外科手术中，手术导致的脑组织变形不可避免，把手术前后的脑组织图像当成刚体进行配准必然会影响配准的准确度，因此需要一种确保完全、通用、有效的方法。

（3）由于需要融合的多种影像基本上都是在不同条件、不同时间所获得的，所以对于融合的效果没有绝对的评价标准，一般采用标记点的配准结果作为“金标准”，但这种评价所使用的操作烦琐且本身就存在变形等因素引起的误差。因此，寻求较好的评价标准也是一个需要解决的问题。

（4）目前的医学图像融合主要集中在CT、MRI和MRI、PET、SPECT的融合中，而涉及超声与其他模态的融合工作比较少见，但超声图像却是最常见、使用得最多的一种模态的图像，同时它还具有物美价廉和实时灵活的特性。因此，进行超声与其他模态图像之间的融合具有重要的实际意义，这对于实现真正意义上的手术导航有决定性的作用。

2. 同机影像融合

同机影像融合是伴随着同机成像设备的发展而发展的。1999年，通用电器公司（GE）推出了全球第一台医用同机影像融合设备Hawkeye，它将CT球管、探测器及放射性核素探头装在同一旋转机架上，患者可同时进行CT和SPECT检查。由于这一台划时代设备的出现，使得影像融合技术发生了根本性的变化。

在图像融合设备成像过程中，患者同时进行两种不同的检查，其体位变化由计算机精确控制，且不同成像间的时间间隔非常短暂，从根本上解决了异机图像融合中的最大难题——配准技术的准确性问题。这是同机影像融合设备最大的优势。

继Hawkeye之后，GE公司、西门子公司及飞利浦先后推出了第二代图像融合设备：PET/CT。目前的临床应用表明，PET/CT所提供的关于疾病的诊断、治疗和预后的信息比单独PET和CT要多很多，它既能完成高档CT的所有功能，又能完成PET的功能，而且20分钟能完成全身扫描，比单纯PET的效率提高了60%以上，还能提供比CT更为准确、快速的心肌和脑血流灌注功能图像。PET/CT融合图像能很好地描述疾病对生物化学过程的作用，鉴别生理和病理性摄取，能在疾病得到解剖证据前检测出早期发病征兆，甚至能探测到直径小于2cm的亚临床型的肿瘤，为临床正确确定放疗的计划靶区（临床靶区与生物靶区相结合）、检测治疗过程中药物和放疗效果提供最佳的治疗方案和筛选最有效的治疗药物。PET/MR现在也已面世并应用于临床。

从现有的情况来看，同机融合从硬件上来说是影像融合的发展趋势，但现在的主要问题是：

（1）由于价格昂贵，目前的应用尚不广泛，临床应用的拓展和价值的评价还需要大量病例的积累。

（2）临床需求通常比较复杂，不可能将所有需要的机器都进行组合。

（3）CT、MRI 技术的革新速度会显著快于同机融合设备中的相应部分，因此新技术带来的优势并不能立刻用于图像的融合。

因而，从充分利用现有资源的角度出发，基于软件配准的异机融合将在很长一段时间内与同机融合技术并存。

参考文献

Antoch G, Saoudi N, Kuehl H, et al. 2004. Accuracy of whole-body dual-modality Fluorine-18 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography and computed tomography (FDG-PET/CT) for tumor staging in solid tumors: comparison with CT and PET. J Clin Oncol, 22 (21): 4357～4368

Grova C, Jannin P, Biraben A, et al. 2003. A methodology for generating normal and pathological brain perfusion SPECT images for evaluation of MRI/SPECT fusion methods: application in epilepsy. Phys Med Biol, 48(24): 4023～4043

Habib Z, Marie-Louise M, Abass A. 2010. The clinical role of fusion imaging using PET, CT, and MR imaging. Magn Reson Imaging Clin N Am, 18: 133～149

Hill DL, Batchelor PG, Holden M, et al. 2001. Medical image registration. Phys Med Biol, 46(3): R1～45

John Y, Larry B, Ronald N. 2000. Combined PET/CT scanner for clinical oncology. The Journal of Nuclear Medicine, 41(8): 1369～1379

Schlaier JR, Warnat J, Dorenbeck U, et al. 2004. Image fusion of MR images and real-time ultrasonography: evaluation of fusion accuracy combining two commercial instruments, a neuronavigation system and a ultrasound system. Acta Neurochir (Wien), 146: 271～276

Seitz O, Chambron-Pinho N, Middendorp M, et al. 2009. 18F-Fluorodeoxyglucose-PET/CT to evaluate tumor, nodal disease, and gross tumor volume of oropharyngeal and oral cavity cancer: comparison with MR imaging and validation with surgical specimen. Neuroradiology, 51(10): 677～686

Thomas B, David WT, Tony B, et al. 2003. SPECT/CT in tumor imaging: technical aspects and clinical applications. Seminars in Nuclear Medicine, 33(3): 205～218

Townsend DW, Cherry SR. 2001. Combining anatomy and function: the path to true image fusion. Eur Radiol, 11(10): 1968～1974

撰稿人：汤伟军　冯晓源
复旦大学附属华山医院

透视神经干细胞移植

Look Through the Neural Stem Cell Transplantation

神经系统是人体最为复杂且最为重要的系统。神经系统损伤如脑卒中、帕金森病、脱髓鞘疾病、老年性痴呆及脊髓损伤等给家庭和社会带来巨大的心理和经济负担。应用神经干细胞自我更新和多分化潜能的生物学特性，移植治疗神经系统损伤或神经系统退行性疾病，已成为一种全新的神经外科治疗途径。

尽管目前应用干细胞移植治疗脑、脊髓损伤的实验研究很多，也有临床观察研究的少数报道，但干细胞移植后如何透过血-脑屏障，其迁移、分化以及能否真正与移植部位的组织整合并建立突触联系等问题仍然是个暗箱，研究者们试图找到一个黑匣子以在体示踪神经干细胞的移植过程。因此，神经影像学面临的难题就是如何发挥影像学优势，建立一个可重复、无创性的客观活体检测平台。

1. 神经干细胞与移植

神经干细胞广泛存在于神经系统，成年嗅球、皮质、室管膜层或者室管膜下层、纹状体、海马的齿状回颗粒细胞下层以及脊髓、隔区等组织中分布着神经干细胞。脊髓损伤时，来自神经干细胞的神经元新生受到抑制，而神经胶质细胞明显增多，其机制可能与生成神经元的微环境有关。移植的神经干细胞在中枢神经系统中具有极强的迁移能力，在病变部位分泌的趋化因子作用下，神经干细胞可以聚集到病变部位，并与神经组织整合，修复病变组织。神经干细胞用于细胞移植的优势在于：①在体外能从供体材料中大量获得；②能保持未成熟和有表型可塑性的特性，使其能够根据需要分化为适当的神经和胶质细胞类型。但各种来源的干/祖细胞或前体细胞的单一细胞移植存在许多缺陷，神经干细胞移植后大多向胶质细胞系分化，不足以修复损伤的脑和脊髓，还可能会加重胶质瘢痕的形成。因此，联合移植有可能真正发挥神经干细胞生长、分化并建立突触联系的成熟功能。

2. 干细胞移植的示踪研究

干细胞移植大脑后无创性监测的实现主要依靠神经影像学技术，不同的成像技术在以下几个方面存在区别：空间与时间的分辨率、穿透深度、成像的能耗、标记的有效性及目前的检测阈值等。目前干细胞脑移植研究的神经成像技术有：

(1)单光子发射计算机断层成（SPECT）：是利用放射性核素（^{99m}Tc、^{111}In、^{123}I和^{201}Tl）等标记物作为显像剂的诊断手段。通过细胞膜表面的受体与配体的互相结

合，来示踪移植细胞。虽然有较高的敏感性，但空间分辨率相对较低。

(2) 正电子发射断层扫描（PET）：去氧葡萄糖正电子断层扫描（FDG-PET）不但可反映组织、器官的解剖形态学结构，更重要的是可反映其摄取利用葡萄糖的功能状况。生理状态下，脑组织以葡萄糖为唯一能量底物，代表神经元的功能活动，神经损伤时该区域葡萄糖代谢下降，因此 FDG-PET 可间接反映移植区神经功能的状况。虽然 ROI 分析过程依靠肉眼观察主观地对局部进行分析，存在费时、主观性强、重复性差、容易导致偏倚等缺点，但在评价神经干细胞移植后移植区神经功能的时相变化时仍有一定价值。用于检测衰变的核素如^{11}C、^{18}F、^{124}I发出的正电子而使注射体内的分子探针显像。目前与神经干细胞移植有关的研究主要集中在帕金森病上，如应用^{18}Fluorodopa（FD）做示踪剂，在移植前后对黑质纹状体多巴胺能系统功能进行评价；也有用于阿尔茨海默病的报道。

(3) 磁共振成像（MRI）：MRI 是临床应用和生物医学研究中的重要方法，具有很高的组织分辨率、空间分辨率、以及无游离辐射、有效成像时间长等优点。亦可用于观察标记细胞的迁移和缺血区的病变体积等与功能相关的参数。因此，在移植干细胞的在体示踪和疗效评价中具有良好的应用前景。

3. MRI 与干细胞移植

神经干细胞成功移植后的脑、脊髓组织功能恢复一方面通过行为学评价得到验证，同时磁共振的结构成像和脑、脊髓功能成像的方法能够直接显示再生的组织，但真正的细胞水平显像必须依赖于磁共振标记物的发展和应用。目前标记干细胞的对比剂主要分为两大类：一类是以钆（Gd^{3+}）为对比剂，即顺磁性对比剂，主要产生 T_1 正性对比效应。目前有关的应用报道不多，主要是因为在目前场强下，Gd^{3+} 的量需要达到相当程度才得以显像，这在技术上尚有难度；另外，钆本身具有一定的毒性。另一类是以单/多晶体氧化铁为基础的对比剂，主要产生较强的 T_2 负性对比效应。其特点是颗粒直径小，穿透能力强，且弛豫率为同样条件下 Gd^{3+} 的 7～10 倍，在很低的浓度就可在 MR 上形成对比。同时铁剂具有生物可降解性，在细胞代谢后进入正常血浆铁池，可参与红细胞血红蛋白的结合或其他代谢过程。氧化铁的以上特点使其颇受关注，是目前最为理想的磁共振示踪剂。超顺磁性氧化铁（superparamagnetic iron oxide，SPIO）是一类由磁性氧化铁晶体构成的物质，其内部磁力总和等于零，只有外界磁场存在时，才具有同方向的强磁性，当外界磁场消失时即不具有磁性，这种对比剂减少了伪信号，增加了准确性和灵敏度。根据颗粒直径大小分为口服超顺磁性氧化铁显影剂（oral SPIO）、标准超顺磁性氧化铁显影剂（SSPIO）、超小超顺磁性氧化铁显影剂（USPIO）及单晶体氧化铁纳米粒子（MINO）等四种，其中前三种已通过 FDA 批准应用于临床。

神经系统是最早应用氧化铁标记的部位。Bulte 等利用转铁蛋白受体的单克

隆抗体结合葡聚糖包被的氧化铁纳米颗粒合成了 MINO-46L-OX-26 对比剂，标记 CG-4 细胞（大鼠少突胶质祖细胞），移植到脱髓鞘大鼠的脊髓，用 4.7T MR 观察到其从注射处向周围迁徙最远达到 8mm，与组织学检查存在很好的一致性。又进一步应用于多发性硬化的动物模型——急性实验性自发免疫性脑脊髓炎（acute experimental autoimmune encephalomyelitis，EAE）大鼠研究中，将新生鼠神经干细胞分别标记上 MINO-46L-OX-26 和 MD-100 后，移植到正常和 EAE 大鼠，考虑到 EAE 病变是多灶性生长，故移植入侧脑室内而不是脑实质内，使细胞有更大的多部位迁移可能。MR 显示在正常大鼠和 EAE 大鼠侧脑室内信号改变很快消失，而只有在 EAE 鼠脑室周围白质包括胼胝体、伞部、内囊等部位发生信号的降低，组织学分析显示在 EAE 鼠，移植的神经干细胞迁移出侧脑室，组织学所在部位与 MRI 所示部位吻合，标记后的神经干细胞大部分分化成胶质细胞。而在正常鼠，细胞不发生迁移，在侧脑室内很快被吞噬细胞所吞噬。Hoehn 用 Sinerem（法国 Guerbet 公司 USPIO 产品）和转染剂标记大鼠胚胎干细胞，移植入大鼠脑缺血对侧半球的皮质下及纹状体，数天后在 MRI 上观察到了移植细胞向缺血部位移行的路径。细胞所含有的铁粒子在移植后均保留在原细胞内，没有被宿主的细胞吞噬。目前的研究结果表明：至少在移植后 18 周内，可以通过 MRI 检测到标记的细胞。

应该说基于磁共振的显像技术为我们打开了干细胞移植的可视化窗口，但至今这种无创影像学还不能继续对分化的干细胞甚至形成的神经突触联系进行在线示踪，随着细胞分子生物学、纳米科学、标记技术及医学影像物理学的发展，在此基础上用 MRI 动态示踪移植的干细胞迁移与转归，并使随时进行体内干预的治疗成为可能。

参考文献

Bogdanov AA Jr, Simonova M, Weissleder R. 2000. Engineering membrance proteins for nuclear medicine: applications for gene therapy therapy and cell tracking. Q J Nucl Med, 44: 224～235

Bulte JW, Ben-Hur T, Miller BR, et al. 2003. MR microscopy of magnetically labeled neurospheres transplanted into the lewis EAE rat brain. Magnetic Resonance in Medicine, 50: 201～205

Bulte JW, Zhang S, van Gelderen P, et al. 1999. Neurotransplantation of magnetically labeled oligodendrocyte progenitors: magnetic resonance tracking of cell migration and myelination. Proc Natl Acad Sci, 96: 1525～1526

Frank JA, Miller BR, Arbab AS, et al. 2003. Clinically applicable labeling of mammalian and stem cells by combining superparamagnetic iron oxides and transfection agents. Radiology, 228: 480～487

Hoehn M, Küstermann E, Blunk J, et al. 2002. Monitoring of implanted stem cell migration in

vivo : a highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat .Proc Natl Acad Sci ,99 :16267～16272

Kurozumi K , Nakamura K , Tamiya T ,et al . 2005 . Mesenchymal stem cells that produce neurotrophic factors reduce ischemic damage in the rat middle cerebral artery occlusion model . Mol Ther ,11(1) :96～104

McPeak LA , Stiers WM , Cope DN . 2001 .Disability evaluation following traumatic brain injury . Phs Med Rehabil Clin N Am ,12 :587

Simonova M , Wall A , Weissleder R ,et al . 2000 . Tyrosinase mutants are capable of prodrug activation in transfected nonmelanotic cells . Cancer Res ,60 :6656～6662

Tuszynski MH , Thal L , Pay M ,et al . 2005 . A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease . Nat Med ,11(5) :551～555

Unger EC . 2003 . How can superparamagnetic iron oxides be used to monitor disease and treatment .Radiology ,229 :615～616

撰稿人:许顺良　楼海燕
浙江大学医学院附属第一医院

多重耐药细菌的快速检测在医院感染控制中的应用

Application of Rapid Detection of Multiple-Drug Resistant Bacteria in Nosocomial Infection Control

感染性疾病是当前严重威胁人类健康的一个重要杀手。美国 CDC 的统计数据显示全美每年 2 000 000 人发生医院感染，其中 90 000 人死于感染。抗菌药物是治疗细菌感染的重要手段，然而细菌对抗菌药物耐药率逐年上升，医院感染中 70% 以上为多重耐药细菌（MDR）引起的感染，给临床治疗带来挑战。

MDR 已经波及临床分离到的各菌属。在革兰阳性菌中，危害最严重的是甲氧西林耐药的金黄色葡萄球菌（MRSA）。2005 年美国 94 360 人发生侵袭性 MRSA 感染，18 650 人死亡，死亡人数超过艾滋病。万古霉素耐药的屎肠球菌（VRE）所致感染，几乎无药可用。全球范围内，碳青霉烯类耐药的鲍曼不动杆菌（CRAB）不断增长，临床可用药物仅仅依赖毒性高的黏菌素。同时，泛耐药的铜绿假单胞菌、碳青霉烯类耐药的肠杆菌科细菌、产超广谱 β-内酰胺酶（ESBL）的肠杆菌科细菌的院内传播，使临床治疗陷入困境。大量研究显示，MDR 所致感染的病死率高于敏感菌，同时患者住院时间延长，医疗花费大幅增加。

由于 MDR 不断增长，临床迫切需要准确快速的检测方法，以便及时正确选用抗菌药物、及时采取适当的感染控制措施阻止耐药的传播。目前，细菌培养和药敏试验仍然是临床微生物室检测多重耐药细菌的主要方法。而这些传统方法培养周期长，通常需要 3～5 天，远远不能满足临床快速诊断、早期治疗、早期控制 MDR 传播的需要。

近年来，一些快速检测 MDR 的新技术涌现出来，包括特定耐药菌的显色培养基、实时荧光定量 PCR、多重 PCR、肽核酸荧光原位杂交（PNA-FISH）、反向线性杂交、高效液相色谱（HPLC）、基因芯片、质谱、新一代测序技术等。与传统方法相比，快速检测技术显示出巨大的优势：①可以直接检测标本中的病原体和耐药基因，无须培养和药敏试验，缩短检测时间；②敏感性高，能够检测出一些低水平耐药性；③快速检测法结果明确，即耐药基因有或者无，而表型药敏试验因不同国家敏感折点不同，判定结果可能不同；④降低传统病原体培养过程中的生物危害风险。因此，新技术快速而准确的检测能力有望指导 MDR 的早期治疗，早期采取控制措施，切断传播链，从而降低耐药。

尽管新的分子技术不断涌现，部分快速检测试剂盒也已应用于临床，但是大

多数快速检测技术仍然停留在实验室研究阶段，距离临床广泛使用仍有相当长的时间。商品化MRSA、VRE、ESBL的显色培养基，虽然节省药敏的时间，但仍需过夜培养；MRSA乳胶凝集试剂快速检测mecA编码的PBP2a蛋白，但仍然需要纯培养的金黄色葡萄球菌；实时定量PCR可以在2小时内直接检测标本中的MRSA，但仪器、试剂昂贵，很难普及。

快速检测技术不能广泛用于临床的一个最重要原因是目前仍有许多耐药机制和致病机制没有完全阐明。随着新型抗菌药物的广泛使用，出现了新发的耐药表型和耐药机制，如利奈唑胺、达妥霉素的耐药机制是近2年才发现的。首先，黏菌素耐药的鲍曼不动杆菌、万古霉素低水平耐药的金黄色葡萄球菌的机制目前仍未完全阐明。其次，MDR的耐药机制通常不是单一的，而是多种因素综合的表现(图1)，只有选择最关键的因素，才能选择最适当的靶基因。例如，CRAB的耐药机制包括产生碳青霉烯酶、外膜蛋白的缺失、外排泵的过度表达等，必须进行大规模的基础研究，阐明耐药的决定因素，才能设计合适的分子检测方法。最后，一些多重耐药细菌的致病机制还没有研究透彻。例如，一些特定克隆系的MRSA引起侵袭性感染，而另一些常常表现为定植，这其中的奥秘至今还未完全揭开。

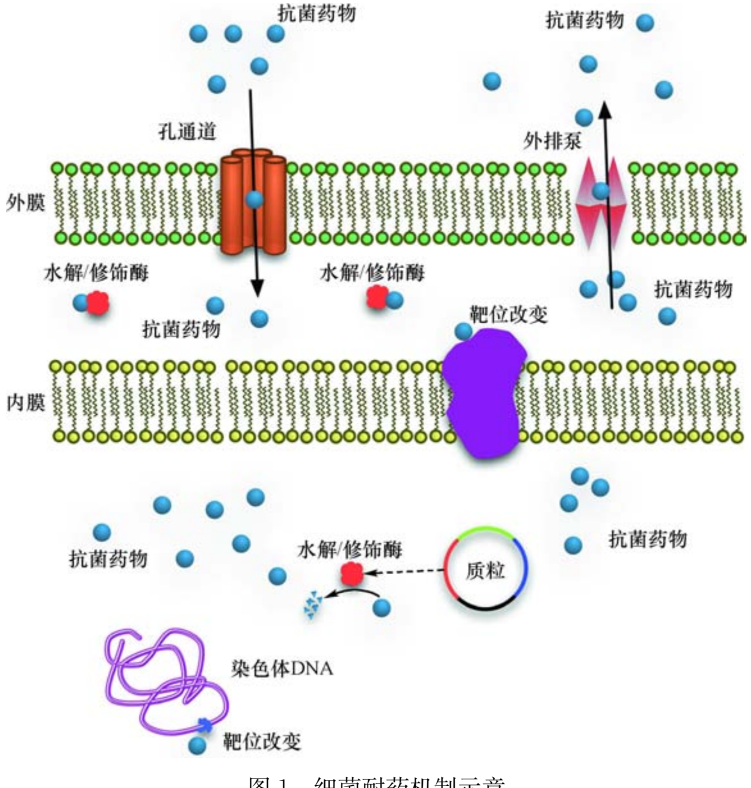


图1 细菌耐药机制示意
引自 Bauman RW. 2008. N Engl J Med

MDR快速检测临床应用的另一个障碍是方法学上还存在诸多问题：①DNA提取的浓度和纯度对随后检测效能起决定作用，而影响DNA浓度和纯度的主要因素是标本的类型（如培养物、血液、组织、粪便等）。如何获得高浓度和纯度的DNA，并尽可能去除PCR抑制剂，尚需进一步优化。②质量保证是快速检测技术的关键。目前，分子检测技术缺乏标准化的操作流程，不同实验室之间结果的重复性差。因此，建立标准化的检测方法和操作规程迫在眉睫。③耐药细菌对不同药物具有不同的耐药机制，如何将这些不同的耐药基因整合在一起，实现高通量，仍需更多的研究。④基因检测的结果有时和表型不一致，这需要临床验证和评估。

目前，一些多重耐药细菌快速检测体系的建立，或许能给我们解决上述难题带来某种思路。Woodford针对临床常见革兰阴性菌的耐药机制，建立3个多重PCR体系，可以同时检测5组CTX-M型酶（groups 1、2、8、9和25）、5种金属酶（IMP、VIM、SPM、GIM和SIM）、4组OXA类碳青霉烯酶（OXA-23-like、OXA-40-like、OXA-51-like和OXA-58-like酶）。基因芯片可以包被大量的耐药基因探针，因此一次杂交可以同时检测许多耐药基因。Perreten等构建的基因芯片平台，可以同时检测革兰阳性菌90个耐药基因。如果能发掘多重耐药细菌的特异蛋白生物标记，将这些蛋白多肽包被在芯片载体上，就可以采用蛋白芯片快速检测MDR。MDR的快速分型对感染控制至关重要，检测菌株同源性的脉冲场凝胶电泳费时费力，无法满足需要。而新的分型方法，如多位点序列分析（MLST）、SNP、多位点串联重复序列（MLVA）等，有望满足医院感染控制的需求。

随着时间的推移，新的MDR会不断出现，人类和多重耐药菌之间的对抗将是一场长期而艰辛的斗争。通过开发MDR的快速检测技术并使之广泛用于临床，我们相信医院内多重耐药细菌的感染和传播将会得到有效的控制！

参考文献

Arias CA, Murray BE. 2009. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century-a clinical super-challenge. N Engl J Med, 360: 439～443

Bancroft EA. 2007. Antimicrobial resistance—it's not just for hospitals. JAMA, 298: 1803～1804

Centers for Disease Control and Prevention. 2000. Public health focus: surveillance, prevention and control of nosocomial infections. Morb Mortal Wkly Rep, 41: 783～787

Diekema DJ, Dodgson KJ, Sigurdardottir B, et al. 2004. Rapid detection of antimicrobial-resistant organism carriage: an unmet clinical need. J Clin Microbiol, 42: 2879～2883

Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, et al. 2007. Active Bacterial Core Surveillance (ABCs) MRSA Investigators. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. JAMA, 298: 1763～1771

Perreten V, Vorlet-Fawer L, Slickers P, et al. 2005. Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of gram-positive bacteria. J Clin Microbiol, 43: 2291～2302
Woodford N. 2010. Rapid characterization of beta-lactamases by multiplex PCR. Methods Mol Biol, 642: 181～192

撰稿人：王　辉
北京协和医院、北京大学人民医院

尿液蛋白质组研究在临床检验应用中的巨大潜力

The Greet Potential of Human Urinary Proteome
in Clinical Laboratory Medicine

尿液作为人体代谢的终产物之一，具有大量留取性、无创性、大规模重复取样性、保存方便等独特的优势。与血液相比，尿蛋白构成相对简单、易于分析，在通过体液诊断疾病方面具有很大优势。尿液的组成、数量与性状的变化不仅携带有泌尿系统疾病发生、发展及预后的各种信息，也反映了机体的整体代谢状态，为研究脏器功能、评价机体状态、代谢情况、动态监测疾病进展和判断疗效等方面提供了各种信息，因此它是诊断和判断疾病分级进展的理想物质，值得我们对其进行进一步的探索与研究。

临床关于尿液应用最广泛的是对尿白蛋白的检测，其次包括尿液中肌酐、尿酸、电解质、免疫球蛋白及几种肿瘤标志物的检测，与血液的检测项目相比仅是冰山一角。国际上关于尿蛋白质组学的研究主要集中于应用经典的蛋白质组学分析方法——双向电泳建立正常或疾病相关尿蛋白质图谱，联合质谱分析鉴定差异蛋白点、筛选疾病相关的生物标志物，为临床诊断及鉴别诊断提供依据。已有研究从正常尿液样品中鉴定出了1543种蛋白质。这些蛋白质在细胞组成方面涉及胞外区、胞外区基质、胞质膜部分等；在分子功能方面可概括为信号转导蛋白、肽酶、酶抑制剂和其他；在生物进程方面涉及免疫反应、应激反应、炎症、创伤修复和凝血等。临床上的应用范围从成人到儿童、新生儿，从泌尿系疾病的前列腺癌、肾细胞癌、膀胱癌、膀胱上皮癌、肾Fanconi综合征、移行细胞癌、1型糖尿病肾病和肾移植急性排斥反应到非泌尿系的冠心病、肺癌、脑卒中等的诊断及治疗后的监测。

目前国内关于尿液蛋白质组学的研究主要集中于不同疾病与正常尿液间差异蛋白的筛选与鉴定，通过蛋白质组学研究的经典方法，即双向电泳、荧光差异双向电泳联合质谱分析筛选出可能的潜在标志物。涉及的疾病从泌尿系统疾病，如肾病（肾脏自身病变导致的急慢性肾功能不全、糖尿病肾病、系统性红斑狼疮肾病、肾移植等）、尿路感染、尿路梗阻、膀胱肿瘤等，到非泌尿系统疾病，如冠心病、肺癌、脑卒中等，研究领域从最初肿瘤标志物筛选到药物治疗耐药性的标志物研究，尤其是在激素耐药型肾病综合征和膀胱癌尿中差异表达蛋白的研究较多，也得到了一些有意义的候选蛋白。无论是肿瘤标志物还是药物治疗的候选蛋

白，都因在后期临床验证过程中的低敏感性或低特异性而限制了其在临床实践中的大规模应用，致使诸多蛋白质仅停留在前期的筛选工作，仍需要大量的研究鉴定出合适的、对临床有指导意义的差异蛋白。对于正常尿蛋白本身的研究国内尚不多，大部分只是将其作为正常对照，忽略了正常尿蛋白自身所携带信息的价值。国外的研究从最初鉴定的 124 种正常尿蛋白到如今的超过 1500 种之多，应用价值及临床应用的空间都很大。

尿液作为检测的理想标本，有着极为广泛的应用前景，然而距离临床大规模检测项目的开展还很遥远，尚面临着许多难题。主要包括以下几个方面：①生理状态下尿液中的蛋白质谱是一切研究的基础，也是必需的参照体系，但目前尚不明确。②生理状态下尿液中各蛋白质浓度的变化规律尚不清楚。尿蛋白的浓度直接受尿量的影响，而日间尿量变异大，受饮食、饮水量、运动状态、精神等诸多因素的影响。③不同病理状态下各蛋白质成分的变化规律也有待进一步明确。尿液中的蛋白质变化受各脏器功能如肾脏功能、肝脏功能、心脏功能等影响，以及代谢状态如凝血系统、蛋白代谢、脂代谢、糖代谢等影响。④不同疾病时具有诊断、鉴别诊断、治疗、预后判断等意义的相关蛋白即不同疾病的生物标志物有哪些有待研究。⑤疾病相关蛋白检验试剂盒的产品开发、临床评价和应用才刚刚起步。⑥由于正常生理状态下尿液中蛋白质的浓度过低，每天尿中排出的蛋白质一般为 40～80mg，上限为 150mg，蛋白质含量不到血液的 1/1000，并且大部分为白蛋白等高丰度蛋白，低丰度蛋白的含量就更低，很难达到一般检测仪器的最低检测限。因此检验方法有待开发，检验技术有待提高。

总之，尿液作为理想的检测标本，虽然受上述问题的限制，严重影响了其应用，但其优势决定了在疾病的诊断、鉴别诊断、治疗、预后判断方面的巨大应用潜力。相信随着检验技术的发展，杂交技术、芯片技术、化学发光技术、质谱技术、毛细管电泳技术等在蛋白质检验中的应用，一定会在尿液蛋白质检验应用方面开辟另一重要的应用领域，必将充分发挥尿液蛋白质在未来研究和应用方面的重要价值。

参 考 文 献

雷婷，张曼.2010.尿液膀胱癌相关肿瘤标记物研究进展.实用检验医师杂志，2(3)：173～176

雷婷，赵旭宏，张曼.2010.正常人尿蛋白质组学研究.广东医学，31(3)：30～32

赵旭宏，靳胜，张曼.2009.前列腺增生的尿液蛋白质组学分析.首都医科大学学报，30(3)：277～281

Caubet C，Lacroix C，Decramer S，et al. 2010. Advances in urinary proteome analysis and biomarker discovery in pediatric renal disease. Pediatr Nephrol，25(1)：27～35

Massimo C，Martino L，Mario M，et al. 2006. Low muscular mass and overestimation of microalbuminuria by urinary albumin/creatinine ratio. Hypertension，56～61

Mesrobian HG. 2009. The value of newborn urinary proteome analysis in the evaluation and management of ureteropelvic junction obstruction: a cost-effectiveness study. World J Urol, 27(3):379～383

Shahbazian N, Hosseini-Asl F. 2008. A comparison of spot urine protein-creatinine ratio with 24-hour urine protein excretion in women with preeclampsia. Iran Kidney Dis, 2(3):127～131

Ste′phane D, Anne GP, Benjamin B, et al. 2008. Urine in clinical proteomics. Molecular & Cellular Proteomics, 7:1850～1862

Vlahou A, Schanstra J, Frokiaer J, et al. 2008. Establishment of a European network for urine and kidney proteomics. J Proteomics, 2:964～973

撰稿人:张 曼

首都医科大学附属北京世纪坛医院

基因检测如何指导肿瘤靶向治疗

How Guiding Targeted Therapy of Cancer from Genetic Detection

针对肿瘤，现有的放疗、化疗无法将其治愈，尤其对于晚期肿瘤更是无计可施。随着近二三十年来人类基因组计划的顺利实施，人类的健康问题已逐渐步入巴德年院士率先提出的“3P”医学时代，即预防（preventive）医学、预测（predictable）医学和个性化（personal）医疗。大量分子靶向药物的不断问世，为肿瘤的个性化治疗开辟了一个全新的领域。分子靶向药物是目前最先进的治疗肿瘤的药物，它与常规化疗药物作用机制截然不同：它是针对肿瘤相关基因研发的，能够识别肿瘤细胞上特有基因所决定的特征性位点，通过与之结合（或类似机制）阻断肿瘤细胞内控制细胞生长、增殖的信号通路，从而阻止肿瘤细胞生长增殖（图 1）。从它的药理机制来看只产生较小的不良反应，不像常规化疗药物杀灭肿瘤细胞的同时也殃及正常机体细胞。

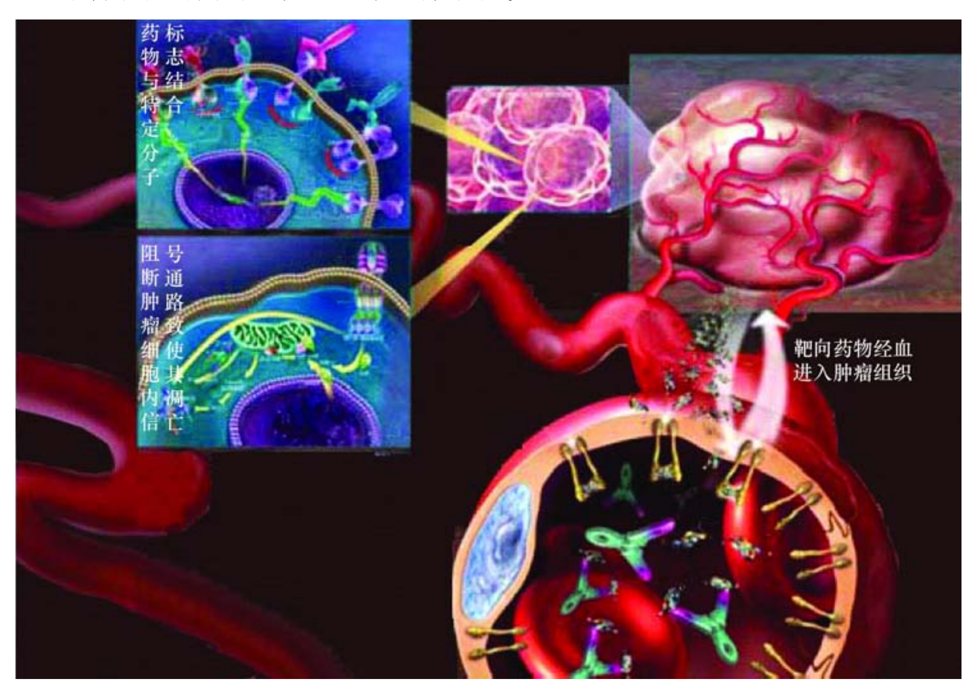


图 1　肿瘤与靶向药物作用示意

引自曾瑄. 2009. 分子病理学诊断在靶向药物中的应用

另一方面，如果患者体内未表达药物作用的靶位，药物就起不到作用，这样不仅浪费了昂贵的药费同时也延误了患者的治疗时机。可见靶向药物在使用前需要检测患者肿瘤组织内是否含有符合条件的基因，只有这样才能判断其肿瘤细胞上是否含有药物靶向位点，预测药物疗效以指导临床用药。如易瑞沙（Iressa），这是一种口服的表皮生长因子受体-酪氨酸激酶拮抗剂（EGFR-TKI），主要用于治疗非小细胞性肺癌。在早期使用过程中，由于其对美国患者治疗效果较差，曾被美国食品药品监督管理局叫停。而该药却在亚洲人群中起到了较好的效果，进一步研究表明只有当患者的EGFR基因发生突变，并且K-RAS基因未发生突变时易瑞沙的治疗效果才会很好，而亚洲人群恰恰容易发生EGFR突变。由此可见，要想充分发挥靶向药物的作用，前提是必须进行相关基因检测，这方面的研究目前已经取得了很大进展，医学上最权威的《新英格兰医学杂志》近年来连续发文，证实EGFR基因突变患者在使用EGFR-TKI时可获得更大疗效；K-RAS基因也被证实为爱必妥疗效相关的独立预测指标。《肿瘤细胞》最新刊登的研究肺癌靶向治疗耐药基因MET的文章，不仅发现耐药位点甚至将肺癌靶向治疗有效率从71%提高到93%。

应用基因检测筛选出适合某种靶向药物的患者的策略虽然势在必行，但要完全实现通过基因检测指导临床肿瘤的靶向治疗，仍然存在很多难题。主要包括以下两大方面：①针对现有的及新开发的各式各样的靶向治疗药物，我们究竟选择哪些基因位点作为检测指标最为科学合理？②在某些靶向药物相关基因位点已知的情况下，面对多位点的基因检测我们应该在临床上采用何种技术，最终达到快速高效、准确灵敏、稳定性好的检测目的？

上述两个问题均制约了基因检测对靶向药物的指导作用的发展，同时也影响了肿瘤个性化治疗的推广使用。目前常用的肿瘤靶向治疗药物主要分为单克隆抗体和小分子化合物两大类：单抗类包括赫赛汀（Hercentin）、爱必妥（Cetuximab，西妥西单抗）；小分子化合物常用的有格列卫（Glivec）、易瑞沙（Gefitinib，吉非替尼）、特罗凯（Erlotinib，埃罗替尼）等（图2）。要想充分发挥每一种药物的作用，就必须探索出与各种药物疗效相关的基因位点，这首先就要面对人类复杂的遗传背景，种族、个体间的遗传差异可导致靶向药物的疗效大相径庭，需要在单核苷酸多态性（SNP）位点分析上进行大量的科研分析工作；再者要面对药物作用及肿瘤细胞生长增殖通路的复杂性，这会进一步增加靶向药物作用位点的多样化。一些药物在抑制细胞信号转导通路的同时还参与其他作用通路，这就产生了非单一的独立预测药物疗效的基因位点。在解决这些大量的疑惑的同时还得关注其与临床实际治疗的相关性，这进一步增加了各种靶向药物相关基因位点确定的难度。部分靶向药物耐药的发生，使我们在确定敏感性相关基因的同时还得关注耐药相关基因，让基因检测指导肿瘤药物的靶向治疗难上加难。

总而言之，要求我们在确定待测基因位点的时候必须综合考虑遗传、药理和临床三方面的关系，不能一叶障目。

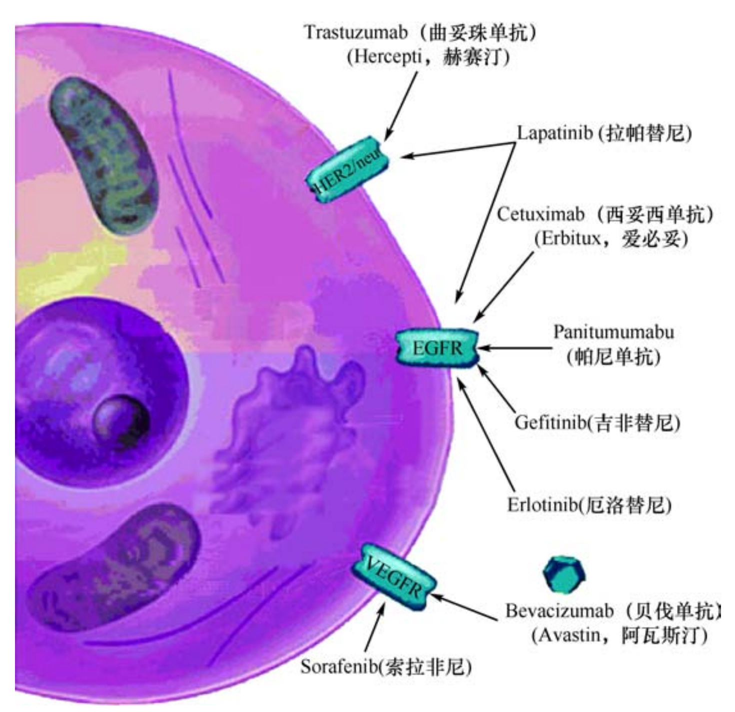


图 2　部分肿瘤靶向治疗药物作用位点

引自曾瑄．2009．分子病理学诊断在靶向药物中的应用

肿瘤靶向药物相关基因位点的难以确定对基因检测技术提出了一个很高的要求。以往的分子生物学技术如 PCR 技术、核酸杂交技术甚至经典的 DNA 测序技术已经远远不能满足科学研究高通量、高效率的要求，尤其在筛选独立相关基因、临床快速检测多基因位点方面需要更多新兴技术的支持。基因芯片技术及新一代高通量平行测序技术的出现大大改善了工作效率，但其重复性较差、技术要求高且检测费用昂贵，限制了它在临床的广泛应用。另外，肿瘤靶向药物相关基因检测的标本必须来源于肿瘤组织，并且首次检测结果不能反映治疗过程中靶基因的消长情况，这又给检测技术提出了另一个难题。

总之，现代分子诊断技术是肿瘤靶向治疗药物和个性化医疗的坚实基础与必要前提。虽然还存在着种种问题，但相信随着科学技术日新月异的发展，分子诊断、靶向药物和个性化治疗方案相结合，能科学合理地为临床肿瘤靶向治疗做出全方位的指导。

参考文献

Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al. 2008. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. N Engl J Med, 359(17): 1757~1765

Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, et al. 2005. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. N Engl J Med, 352(8): 786~792

Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. 2009. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. N Engl J Med, 361(10): 947~957

Sunaga N, Tomizawa Y, Yanagitani N, et al. 2007. Phase Ⅱ prospective study of the efficacy of gefitinib for the treatment of stage Ⅲ/Ⅳ non-small cell lung cancer with EGFR mutations, irrespective of previous chemotherapy. Lung Cancer, 56(3): 383~389

Turke AB, Zejnullahu K, Wu YL, et al. 2010. Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC. Cancer Cell, 17(1): 77~88

撰稿人：陈　鸣　黄恒柳

第三军医大学第三附属医院

如何早期发现恶性肿瘤——肿瘤标志物

Could Cancer Be Detected Earlier—Tumor Markers

近年来，我国癌症的发病率逐年攀升，根据权威机构的数据显示：在我国部分城市和农村，恶性肿瘤已经超过了脑血管疾病和心脏病，成为导致居民死亡的“第一杀手”。但是癌症实际上是一个可治的疾病：当科学家发现宫颈癌与人乳头状瘤病毒（HPV）有关后，宫颈癌便成了“最容易被治愈的癌症”，如果能早期发现，治愈率几乎可达 100%；早期乳腺癌治愈率可达 90% 以上；大肠癌早期治愈率在 80% 以上；此外，甲状腺癌、皮肤癌、间质瘤、绒癌等，虽然在我国发病率较低，但只要能尽早发现，5 年生存率大约能达到 80%。

如何才能早期发现恶性肿瘤呢？

目前临床上现有的恶性肿瘤检测手段主要是影像学和肿瘤标志物。对于恶性肿瘤的早期发现，肿瘤标志物较影像学具有明显的优势。Tubiana 和 Collins 研究发现癌细胞的倍增时间为 27～83 天，理论上物理检测极限为 10^9 个细胞，临床上 CT、磁共振等影像学检测阈值为 1～2cm，含 $10^{10\sim12}$ 个癌细胞，而肿瘤标志物的检测阈值为 10^8 个细胞（图 1），临床也已经验证了 AFP 阳性可比影像学检测早 6～9 个月发现异常。且肿瘤标志物较影像学更加方便、快捷，因此更加适用于恶性肿瘤的筛查和临床诊断。

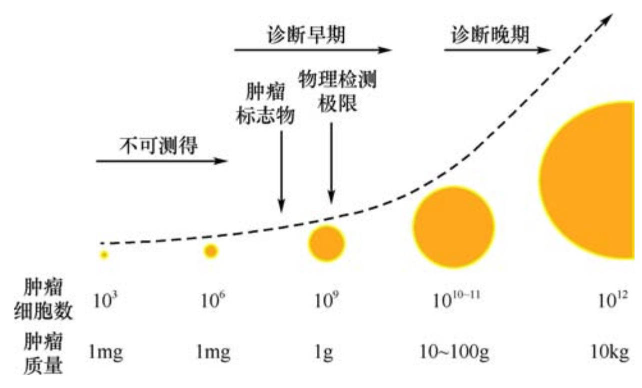


图 1 肿瘤细胞的生长发育过程

修改自周新，涂植光．2003．临床生物化学和生物化学检验

恶性肿瘤生物学特性复杂，基因表达多样，其发生和发展是一个多因素、多

基因参与的多阶段过程。正常细胞在外界不同致癌因素作用下，细胞遗传特性发生改变（如原癌基因的活化和抑癌基因的缺失等），在经过起始（initiation）、促成（promotion）及进展（progression）阶段后，逐渐发展为癌细胞（图 2），由癌细胞组成的癌灶，不断增大、转移并破坏正常组织，严重损害器官功能。这一过程中涉及多种复杂的分子通路，其中产生的物质均有可能作为肿瘤标志物，这也决定了肿瘤标志物的复杂性、多样性。至今，肿瘤标志物的发现已有 100 多年的历史，临床常规应用的有十几种，但是目前这些肿瘤标志物在恶性肿瘤早期发现中的应用尚不理想。以 CEA 筛查一组结肠癌为例，发病率为 37/10 万，假阳性数高达 4998 人，而检出的结肠癌患者只有 26 人。现有的临床应用的肿瘤标志物常缺乏器官特异性，不同脏器或者同一脏器不同大小的肿瘤缺乏相应的标志物进行评估，另外，部分恶性肿瘤至今尚未发现相应的肿瘤标志物，这些都是临床上亟待解决的难题。

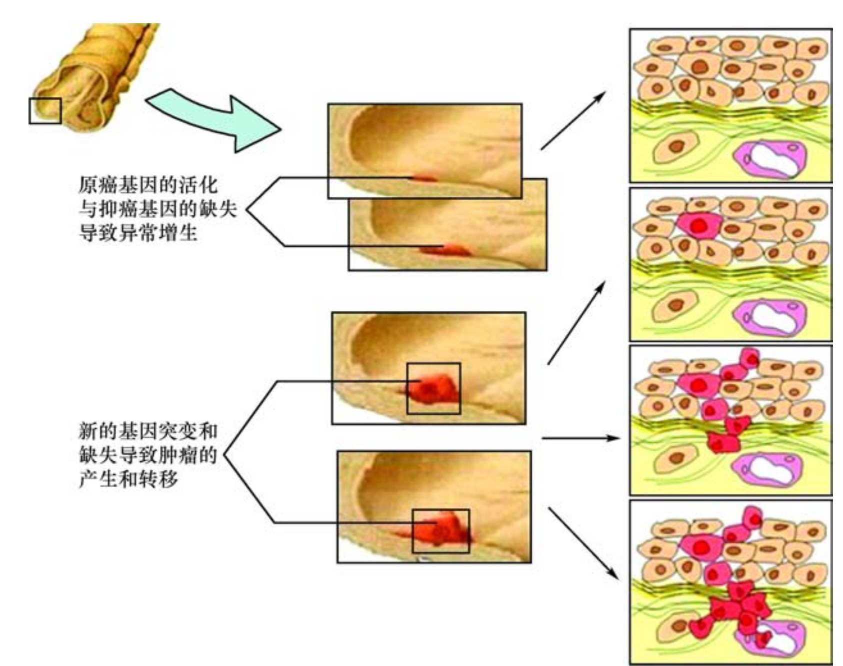


图 2　肿瘤发生发展的多阶段过程

敏感性和特异性更强的恶性肿瘤早期诊断标志物的发现迫在眉睫，新技术的发展为其提供了更广阔的平台。其中蛋白质组学（图 3）的出现从细胞整体水平显示细胞内蛋白质表达谱发生变化，将一次只能测定一个蛋白质标志物发展到一次可以测定数十个、数百个蛋白质，极大地提高了对肿瘤标志物研究的效率。Petricoin EF 等科学家鉴定出一些候选的蛋白质作为恶性肿瘤的生物标志物，且

通过盲法试验得到高的诊断敏感度和特异度，其中有五个新的标志物被美国食品药品管理局批准用于血浆或血清测定。Keshishian 及 Hoofnagle 等应用稳定同位素稀释多反应监测质谱（SID-MRM-MS）与稳定同位素标准抗肽抗体捕获（SISCAPA）技术从大量的最初候选蛋白质标志物中筛选出少量值得进一步研究的标志物，再用临床承认的分析平台进行候选物确认研究，特异性较强的蛋白质不断被发现，并显示了良好的应用前景。另外，基因芯片技术可以对上万种基因的表达、突变和多态性进行快速准确的检测，其精确性可以达到单个细胞中的一个拷贝，在恶性肿瘤的早期诊断中发挥了重要作用，Kikuchi 等使用 cDNA 芯片杂交分析可以明显区分病变的不同组织细胞类型，并且根据其中 40 个基因的表达水平不同可以区分是否有淋巴结转移。近几年代谢组学的提出为肿瘤标志物的发现提供了另一路径，已报道的肿瘤特异性代谢产物涵盖各类生物大分子的物质代谢，代谢组学从机体的动态代谢途径寻找肿瘤等疾病特异性代谢产物，识别人体疾病代谢状态的差异，从而进行疾病诊断和分类。新技术的进展给肿瘤标志物的发现、验证和确认带来关键性进步，也为其进一步研究指明了方向。

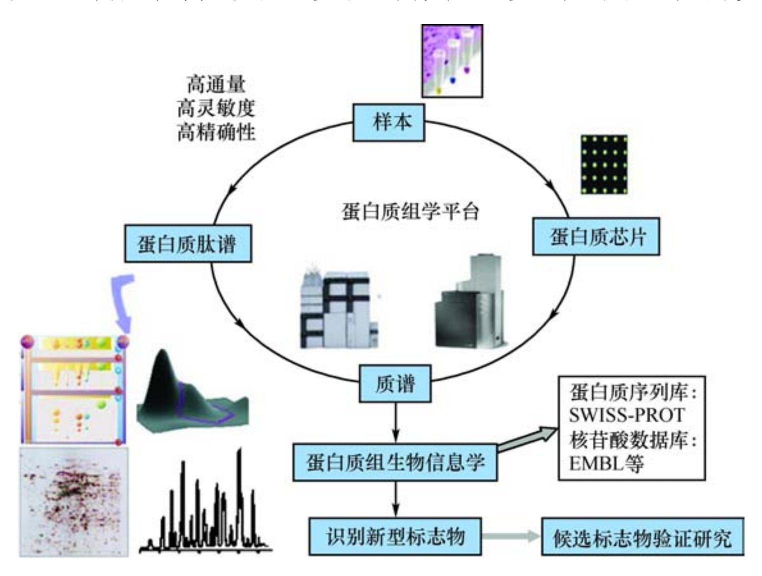


图 3　蛋白质组学技术方案示意

摘自 http：//www.ebiotrade.com/newsf/2009-4/2009423152822436_2.htm

在传统肿瘤标志物的基础上，结合新发现的特异标志物进行系统评估并应用于肿瘤的早期发现，也是目前面临的重要问题。针对不同系统、不同组织器官的恶性肿瘤及肿瘤的不同分期选择恰当的肿瘤标志物，并通过大量的临床病例验证及跟踪随访，筛选出最佳的肿瘤标志物组合，用于肿瘤的早期诊断。相信在不久的将来，随着对肿瘤发生、发展及临床和基础研究的深入，恶性肿瘤的早期发现

将成为可能，对肿瘤的早期治疗提供科学的指导意义。

参 考 文 献

Hoofnagle AN, Becker JO, Wener MH, et al. 2008. Quantification of thyroglobulin, a low-abundance serum protein, by immunoaffinity peptide enrichment and tandem mass spectrometry. Clin Chem, 54(11): 1796～1804

Keshishian H, Addona T, Burgess M, et al. 2007. Quantitative, multiplexed assays for low abundance proteins in plasma by targeted mass spectrometry and stable isotope dilution. Mol Cell Proteomics, 6(12): 2212～2229

Kikuchi T, Daigo Y, Katagiri T, et al. 2003. Expression profiles of non-small cell lung cancers on cDNA microarrays: identification of genes for prediction of lymph-node metastasis and sensitivity to anti-cancer drugs. Oncogene, 22(14): 2192～2205

Petricoin EF, Belluco C, Araujo RP, et al. 2006. The blood peptidome: a higher dimension of information content for cancer biomarker discovery. Nat Rev Cancer, 6(12): 961～967

Sikaroodi M, Galachiantz Y, Baranova A. 2010. Tumor markers: the potential of "omics" approach. Curr Mol Med, 10(2): 249～257

Villanueva J, Martorella AJ, Lawlor K, et al. 2006. Serum peptidome patterns that distinguish metastatic thyroid carcinoma from cancer-free controls are unbiased by gender and age. Mol Cell Proteomics, 5(10): 1840～1852

Yildiz PB, Shyr Y, Rahman JS, et al. 2007. Diagnostic accuracy of MALDI mass spectrometric analysis of unfractionated serum in lung cancer. J Thorac Oncol, 2(10): 893～901

撰稿人：王传新
山东大学齐鲁医院

快速鉴定及耐药性——结核病感染控制的难题

Rapid Identification and Drug Resistance of Tuberculosis ：It Is Problem

近年结核病在全球死灰复燃，已成为重要的再发传染病。我国结核病人数仅次于印度，居世界第二，每年新发结核病人 130 万，死于结核病者约 13 万。由于结核病的早期诊断十分困难和多重耐药菌（MDR-TB、XDR-TB）的出现，致使结核发病率和死亡率不断升高，已成为严重威胁人类健康的全球性公共卫生问题。

目前临床常用的经典的结核病细菌学检查主要是痰涂片和痰菌培养。涂片简便、快速、价廉，但敏感性低（显微镜检阳性需 5000～10 000 个菌/ml，检出率仅 10% ～30% ）、特异性差，也无法鉴定到种。而被誉为结核病诊断“黄金标准”的细菌培养法虽灵敏度略高于涂片，但通常需 2～8 周才能获得结果，还需更长时间进行菌种鉴定，以致目前临床结核病漏诊或延误诊断和治疗现象非常普遍，建立敏感、特异、快速的结核菌鉴定方法已迫在眉睫。

自 1998 年结核基因组序列公布以来，大部分编码蛋白质的功能基因得以阐明，特别是运用双向电泳和质谱技术，在蛋白质水平上分离和鉴定出具辅助诊断潜力的结核杆菌菌属抗原、糖脂类抗原、BCG 缺失抗原等蛋白质抗原，为结核病特异性诊断奠定了基础。但众多的结核分枝杆菌特异性抗原在结核诊断中如何应用尚无定论，用单一抗原进行鉴别诊断的效果不够理想，用多种特异性抗原可以在不影响特异性的基础上获得比单一抗原更高的敏感性。因此，相关抗原蛋白的融合表达或几种抗原的联合应用应是今后结核诊断的发展方向。

随着分子生物学的快速发展，结核的分子诊断技术也逐渐建立。与传统方法相比，基于 IS6110、16SrDNA、23SrRNA 等结核杆菌靶序列，进行 DNA 扩增法（PCR）、PCR-限制性片段长度多态性、实时荧光定量 PCR、DNA 测序、DNA 条带检测、DNA 探针技术和生物芯片等快速检测技术已显示出巨大的优势：具有高度的灵敏性（结核菌 2 条/ml 以上即可能检出）和特异性（应用特异引物直接鉴定到菌种）；数小时内完成，明显缩短了结核鉴定时间。但目前分子诊断技术多应用于纯培养物的鉴定，临床标本则限于痰涂片阳性及临床高度怀疑结核感染患者的痰标本，对于肺外标本 PCR 检测的应用尚需进一步进行临床评估。另外，应用直接标本进行 PCR 检测还存在诸多方法学问题：针对不同标本类型（如痰、血液、组织、粪便等）如何进行合适的前处理，以期获得高浓度和

纯度的 DNA，并尽可能去除 PCR 抑制剂，尚需进一步优化。分子诊断技术所需设备昂贵，操作技术复杂，对人员技术要求和实验室环境条件要求较高，进行大范围普及尚待时日。目前，分子检测技术还缺乏标准化的操作流程，不同实验室之间结果的重复性差。

多重耐药结核菌的检测同样是结核病感染控制的关键。美国 CDC 报道 MDR-TB 暴发流行时病死率高达 72% ～89% 。我国约有 MDR-TB 患者 50 万，每年新发 MDR-TB 患者约 12 万。由于 MDR-TB 和 XDR-TB（图 1）不断增长，临床迫切需要准确快速的方法，以便及时正确地选用抗菌药物，及时采取感染控制措施，以阻断耐药结核菌的传播。传统的结核耐药检测方法主要包括绝对浓度法、抗性比率法和比例法，这些方法均是应用阳性培养物，通常需要 2～8 周，

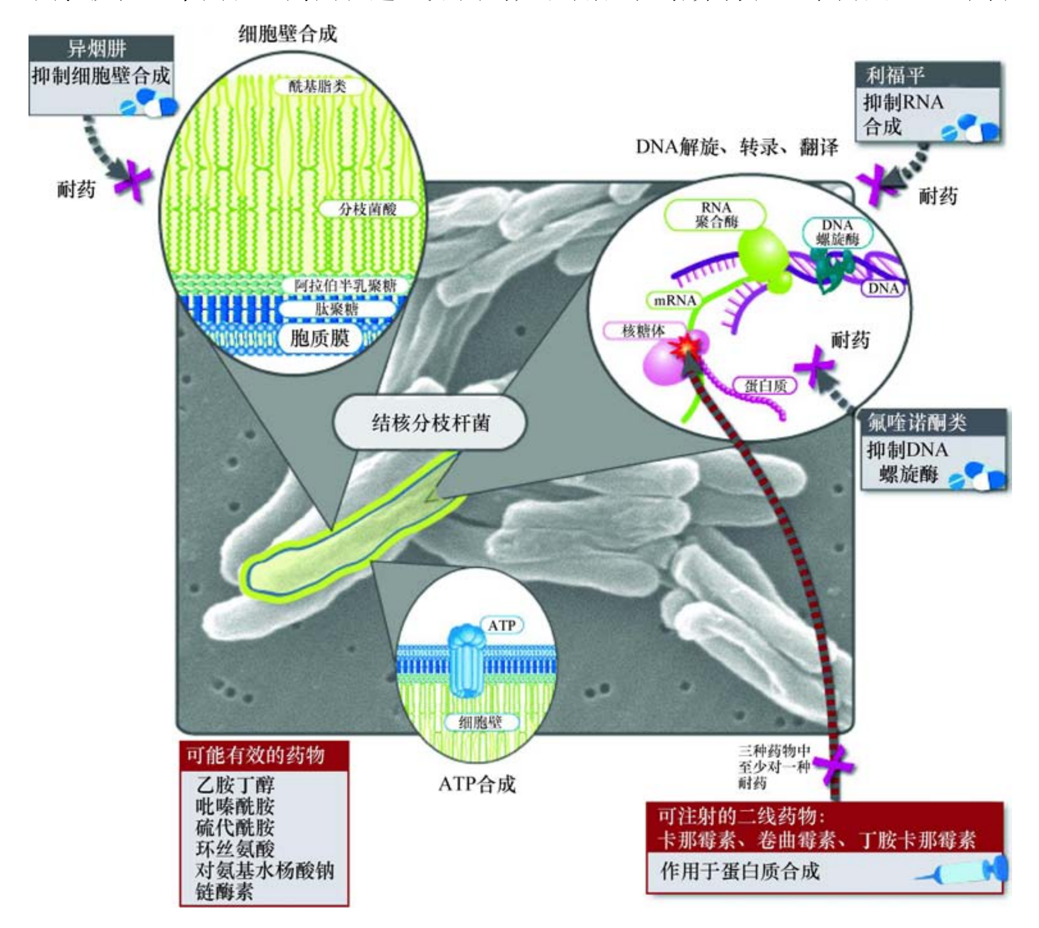


图 1　主要抗结核药物作用机制

摘自美国卫生部过敏与感染性疾病委员会官方网站 http：//www. niaid. nih. gov/topics/tuberculosis/Understanding/WhatIsTB/ScientificIllustrations/Pages/extensivelyDrugResistantIllustration. aspx

远远不能满足临床快速诊断、早期治疗、早期控制耐药菌传播的需要。

近年来分子诊断技术在耐药结核菌检测中已开始应用，如基因靶点检测 rpoB 及 katG 基因突变分别为利福平和异烟肼耐药，应用等位基因特异性 PCR、PCR-线性探针杂交检测、DNA 测序、基因芯片、实时荧光定量 PCR、变性高效液相色谱等技术检测多种耐药基因比传统的药敏试验更快、更可靠。基因型检测方法可直接对临床样本进行耐药性菌株的基因型检测，降低由于微生物培养过程中增殖所造成的实验危险性。

尽管分子技术方法检测结核菌耐药基因有上述优点，但至今未能广泛应用于临床，其原因除 DNA 提取及质量保证等方法学问题，尚存在其他问题。首先，仍有许多耐药机制还没有完全阐明，一些药物耐药的机制与相关基因的突变关系尚未完全阐明，除了 rpoB 基因突变在耐利福平菌株中占 95% ～98% ，其他主要基因突变在相应耐药菌株中的比例均在 80% 左右，说明还存在其他的耐药机制及耐药基因。其次，耐药结核菌对不同药物具有不同的耐药机制，如何将这些不同的耐药基因整合在一起进行高通量检测，仍需更多的研究。最后，基因检测结果和传统药敏结果不一致的现象很难给出一个合理的解释，需要大量临床验证和评估。

我们相信，通过联合检测标本中的特异性结核抗原，分析结核患者的血液及其他排泄物成分，寻找结核患者特有的标志性成分，进行分子标志诊断，开发新型的高通量结核耐药基因检测试剂盒和结核耐药基因芯片系统等技术，势必为解决结核病的感染和控制这一难题开辟新途径。

参考文献

Cho EH , Bae HK , Kang SK ,et al . 2009 . Detection of isoniazid and rifampicin resistance by sequencing of katG , inhA , and rpoB genes in Korea .Korean J Lab Med ,29(5):455～460

Costa ER ,Ribero MO ,Silva MS ,et al . 2009 . Correlations of mutations in katG ,oxyR-ahpC and inhA genes and in vitro susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* prevalent countries in South America . BMC Microbiol ,9 :39

Evans J ,Stead MC ,Nicol MP ,et al . 2009 . Rapid genotypic assays to identify drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in South Africa . J Antimicrob Chemother ,63(1):11～16

Migliori GB , Sotgiu G , D'Arcy Richardson M ,et al . 2009 . MDR-TB and XDR-TB : drug resistance and treatment outcomes . Eur Respir J ,34(3):778～779

Mustafa AS . 2005 . Mycobacterial gene cloning and expression ,comparative genomics ,bioinformatics and proteomics in relation to the development of new vaccines and diagnostic reagents . Med Principles Pract ,14(1):27～34

Purohit M R ,Mustafa T ,Sviland L . 2008 . Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction with DNA eluted from aspirate smears of tuberculosis lymphadenitis .Diagn

Mol Pathol,17(3):174～178

Purohit MR,Mustafa T,Wiker HG,et al. 2007. Immunohistochemical diagnosis of abdominal and lymph node tuberculosis by detecting *Mycobacterium tuberculosis* complex specific antigen MPT64.Diagn Pathol,2:36

撰稿人:尚　红
中国医科大学附属第一医院

预防医学篇

“来无影去无踪”的 SARS

SARS：Come and Go Without a Trace

SARS 是严重急性呼吸综合征（severe acute respiratory syndrome）的简称，又称非典型肺炎，其发生突如其来，令人猝不及防。2002 年 11 月，广东省佛山市出现了非典型性肺炎病例。在 2003 年 1～3 月，中国香港地区、越南、新加坡、加拿大及其他国家和地区陆续出现病例。接着这种疾病被命名为 SARS，随后一种新型冠状病毒（SARS-CoV）被证实为病原体。冠状病毒是一类可以导致人类和动物患病的有外壳的、单链 RNA 病毒，之前已知的影响人类的冠状病毒只导致普通感冒。

这次在 21 世纪初发生的影响全球的首次大流行导致 5 大洲的 26 个国家和地区的超过 8000 人发病，其中约 775 人死亡。在 2003 年 7 月我国台湾最后一起 SARS 传播被切断后，全球发生了 3 起实验室源感染事件，之后未见报道出现新的病例。包括我国在内的世界各国采取的隔离患者和密切接触者、切断传播途径等手段成功地消除了 SARS 在人与人之间的传播。

尽管在整个过程中，国内外科学家对 SARS 的病原体、流行病学、诊断、治疗等进行了大量的研究工作，在疾病的病因、临床、预后因素等方面取得了相关的科学证据，但是在流行病学方面还有一些问题没有得到明确的答案，例如传染来源、出现超级传播者的原因、确切的潜伏期、感染途径与潜伏期的关系、隐性感染者是否具有传染性、儿童之间是否存在传播、是否存在动物宿主等。对这些问题的探索和研究可以加深对 SARS 这一疾病的认识，提高科学研究能力，对于防范 SARS 卷土重来或者其他传染病等公共卫生事件具有重要意义。

人群的血清流行病学调查数据显示，SARS-CoV 在人群中从未发生过小范围流行，提示这是一种主要感染动物的病毒，在 2002 年 SARS 流行之前具有了跨越种属差异感染人类的能力。2002 年 11～12 月，广东省感染 SARS 的患者曾经因职业原因有接触笼装、活的动物的经历。在广东销售食用野生动物的一个市场的喜马拉雅狸猫（果子狸）和貉分离到类似于 SARS-CoV 的冠状病毒。另外，在广东省参与野生动物交易的人员与市场中的其他人员或者其他对照人群相比，其 SARS-CoV 的血清阳转率的比例更高。上述发现支持 SARS-CoV 起源于动物的假设，食用野生动物交易市场可能是发生跨种传播的潜在场所。实验研究显示，SARS-CoV 可以感染类似于雪貂和猫之类的小型哺乳动物，并可以使雪貂

患病。对从捕获的野生动物和家养动物中分离的病毒进行基因分析，将有助于确认自然界中该病毒的动物宿主。

研究显示 SARS-CoV 的传播力要弱于预期，从总体上看每个患者平均传播 2～4 个二代病例。但是 SARS 的一个特点是少量的患者造成了大量感染，这些被称为超级传播事件。

由对暴露于 1 个传染源而引起的 SARS 病例的研究显示 SARS 的潜伏期为 2～10 天，中位数为 4～7 天。使用最大似然比的方法进行估计，计算获得平均潜伏期为 6 天，最长潜伏期为 14 天。在暴露史数据不完整的一项调查中发现一些病例的潜伏期长达 20 天。尚不清楚感染途径是否会对潜伏期产生影响。

有研究证实存在无症状或轻症患者，但数量较少，未发现这些人对疾病的传播产生作用。新加坡的一例实验室获得性 SARS 轻症患者的密切接触者中没有发生新的病例。没有从无症状患者分离到病毒的报道，已进行的血清学和流行病学调查没有发现无症状患者造成的新发感染。

在卫生机构和医院中一般患者发病 5 天后以及病情严重的病例的传染性较强，这与患者体内病毒载量在感染后第 10 天达到高峰相一致。没有在出现症状之前，即潜伏期内有传染性的报道。尽管在患者发病后 30 天仍然可以通过 RT-PCR 方法检测到病毒核酸，但是在患者病程的第 3 周已经很难分离到病毒。这与流行病学调查中在患者发热缓解 10 天后没有发现新的传播相一致。

SARS 主要由直接或间接接触具有传染性的呼吸道分泌物而传播。尚不清楚粪-口传播的作用，但是这一途径可能很重要。因为大量的水样腹泻是 SARS 的一个普遍症状，在粪便中病毒含量较高。虽然没有报道发生经食物或水传播，有必要对这些途径的传播作用开展研究。

有两起研究报道儿童 SARS 患者传播给成人，未见儿童感染其他儿童或垂直传播的报道。

在目前的形势下，可以通过对现有关于 SARS 的文献进行汇总、整理、分析，以期挖掘出潜在的信息；另外，对当时获得的调查资料和数据进一步进行分析，对未解决的问题所需要的信息和资料进行补充调查；在严格遵守生物安全的条件下开展实验，开展具有代表性的调查，探索研究是否存在动物宿主。由于冠状病毒具有人兽共患的特点，SARS 有在动物间传播的可能，宿主动物可能为隐性感染或者症状轻微，因此应该保持警惕，建立长效应急机制。

参考文献

Bender JB，Hueston W，Osterholm M 2006. Recent animal disease outbreaks and their impact on human populations. Journal of Agromedicine，11(1)：5～15

Breiman RF，Evans MR，Priser W，et al. 2003. Role of China in the quest to define and control se-

vere acute respiratory syndrome. Emerg Infect Dis, 9: 1037～1041

Cyranoski D, Abbott A. 2003. Virus detectives seek source of SARS in China's wild animals. Nature, 423: 467

Dye C, Gay N. 2003. Modeling the SARS epidemic. Science, 300: 1884～1885

Guan Y, Zheng BJ, He YQ, et al. 2003. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. Science, 302: 276～278

Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith C, et al. 2003. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. N Engl J Med, 348: 1967～1976

Peiris JS, Lai ST, Poon LL, et al. 2003. Coronavirus as possible cause of severe acute respiratory syndrome. Lancet, 361: 1319～1325

Periris JS, Yuen KY, Osterhaus DO, et al. 2003. The severe acute respiratory syndrome. N Engl J Med, 349: 2431～2441

Zeng Guang, Xie Shu-yun, Li Qin, et al. 2009. Infectivity of severe acute respiratory syndrome during its incubation period. Biomedical and Environmental Science, 22: 502～510

Zhong NS, Zheng BJ, Li YM, et al. 2003. Epidemiological and aetiological studies of patients with severe acute respiratory syndrome (SARS) from Guangdong in February 2003. Lancet, 362: 1353～1358

撰稿人：曾　光

中国疾病预防控制中心

复杂系统理论指导下的流行病学整合

Integration of Epidemiology with Complex System Theory

流行病学（epidemiology）是研究人群中特定疾病和健康状况的分布及其决定因素和过程规律，并研究防治疾病及促进健康策略和措施的科学。预防控制疾病及促进健康是流行病学的研究目的。随着社会经济和医学科学技术的发展，流行病学领域所要研究解决的问题正面临健康转型变化的挑战。人类社会健康模式已从以高出生率、高死亡率为特点，以传染性疾病和营养不良为主的疾病模式转向以低出生率、低死亡率为特点，以慢性非传染性疾病为主的疾病模式。影响人类健康与主要慢性疾病发生的因素已经远远超出了既往传染病研究涉及的范围，构成了一个植根于人类自身生产方式、生活方式与社会制度、生态环境和科技发展水平交织在一起的多维复杂的系统健康环境。在这样的健康模式转变过程中，既往流行病学通过研究传染源、宿主及传播途径所建立的相对简明、线性或准线性关系的研究理论与方法已经不能满足揭示复杂健康环境与复杂疾病发病过程与规律研究的需要。流行病学面临着认识人类健康与自身行为和自然环境相互作用关系与后果的重大研究命题。

健康与疾病相关因素及其相互作用是一个巨大开放的复杂系统。各种病原微生物，各种致病危险因素，处于不同年龄、性别和社会经济发展状态下的个体，不同社会制度下社会经济发展条件与管理方式，地球上广大地域、民族和文化，所有这些因素构成了各自的复杂系统。各系统之间、之内相互影响、相互作用，不断形成新的状态和动力，对人体健康状态与疾病发生发展方式产生影响。流行病学研究不仅要了解新发传染病和慢性疾病自身的发生、发展规律，还要了解人的精神、行为与疾病的关系，以及自然环境、社会环境变化与人类健康的关系等等。这些研究已远远超出经典流行病学的认识范围，表明流行病学在研究指导理论与方法学上都需要提升。

研究揭示产生复杂系统结构、动力、相互作用和规律的科学被称为复杂性科学（complexity science）。复杂性科学被称为“21世纪的科学”，指导复杂性科学研究的理论即为复杂系统理论。这是一门正在形成、不断被充实和完善的领域和理论，没有人能为其准确定义，但其所具有的最大特点是要求对事物存在、运动、发展的过程、规律与机制做出超越简单线性思维的立体理解。广义地讲，复杂系统是由多个相对独立的子系统所组成。这些子系统在多方面进行着相互作

用，这些相互作用产生了新的结构与功能：表现为空间、时间上的差异、联系和新的行为，以及自我调整能力与动力。这些联系、调节与动力以网络形式存在，形成不同层面和维度上交互作用的巨大立体空间。例如，大量不同的蛋白质、核酸、脂肪、多糖构成了细胞；成亿的不同细胞相互关联作用不仅构成了组织、器官，而且具有特定的功能；成千上万个相互依存的个体组成了社会。生物体与生命活动是复杂系统，地球生态环境、人类社会都是复杂系统。每一种复杂系统都有着无穷的变化、适应和发展能力。

现代著名科学家钱学森在阐述开放复杂巨系统研究方法学时指出，目前能够有效处理开放复杂巨系统研究的方法为定性定量相结合的综合集成方法。完成从定性到定量综合集成需要将复杂系统理论、经验知识与数据资料、量化科学技术手段和领域专家判断力相结合。复杂系统理论指导下的流行病学研究需要开展多维健康相关因素相互关系的定性定量研究，不仅需要在各个与健康相关的因素方面建立起关联关系（定性），而且需要展示其间的量化关联程度（定量）；探讨主要慢性疾病相关因素输入-输出反应特性，研究反应的类型和反应时间，建立能够再现不同健康状态、疾病相关因素互相作用子系统（人体各生理、病理生理过程，各健康相关环境）的结构、功能、输入-输出反应关系的数学模型、逻辑模型。在此基础上借助计算机运算能力，达到系统仿真；开展实验室内的特定疾病或健康环境系统仿真研究。通过系统仿真可以了解健康与疾病的系统动态特性以及对未来趋势进行预测，形成系统分析；在系统分析的基础上进行符合疾病防控和健康促进目标的优化策略与措施选择。这里用几行字所描述的研究任务可能需要几十年的时间开展推进。从两维数点的线性关系发展到多维立体非线性关系研究不仅是对人的思维习惯与能力的挑战，也需要更强、更新的技术和方法的支持。今后流行病学研究将面临着复杂多因素数据采集处理、多因素相互作用关系的定性定量分析、空间与时间变化分析、模型计算、后果检验等一系列问题。面临的问题越复杂，所需的数据采集和数学分析提取工具就会越多，将涉及遥控、遥感、实时监测技术，涉及概率分布、随机过程及自组织理论。这意味着现有和将来的互联网技术、概率学、统计学、数学建模及非线性分析等经典量化科学技术手段和控制论、信息论、系统自组织理论、现代计算机科学将越来越多地与流行病学研究相结合；也意味着在复杂系统理论指导下的流行病学研究体系内将整合更多的学科参与。

复杂系统理论指导下的流行病学整合过程不仅是对流行病学领域内思维方式与指导理论的反思，也包括对新学科思想与技术方法的吸收接纳。这一整合过程既是应对客观研究世界变化的需要，也是流行病学研究水平与能力提升的必经之路。流行病学领域内外研究人员对此过程的认识与参与将决定这一整合实现的进程。

参 考 文 献

钱学森，于景元，戴汝为. 1990. 一个科学新领域——开放的复杂巨系统及其方法论. 自然杂志，13(1)：3～10

Colizza V，Barrat A，Barthelemy M，et al. 2007. Modeling the worldwide spread of pandemic influenza：baseline case and containment interventions. PLoS Med，4(1)：13

Jonathan Rees. 2002. Complex disease and the new clinical science. Science，698～700

Schlessinger L，Eddy DM. 2002. Archimedes：a new model for simulating health care systems-the mathematical formulation. Journal of Biomedical Informatics，35：37～50

撰稿人：张铁梅
北京医院

定性研究在临床流行病学中的应用

Application of Qualitative Research in Clinical Epidemiology

定性研究方法源于社会学。近几十年来，医学卫生领域如中医学、护理学、临床流行病学、公共卫生学、全科医学、慢性病和癌症研究等纷纷引入并广泛应用定性研究方法，不仅大大丰富了临床和医疗卫生研究的手段，而且较单纯定量研究获得了更多的信息，得到了更可靠全面的结果。这使得临床医学研究更接近真实，不仅反映了研究对象的客观世界，同时也高度重视其主观世界。国外对于医学定性研究从方法学到实际应用相对较系统、广泛和深入，国内临床医学研究特别是中医学、护理学等领域也已引入并开始尝试应用。

定性研究旨在针对目前定量研究尚无法回答的问题加以研究。它丰富了临床流行病学的研究方法，特别是对主观现象的研究，拓展了临床流行病学的研究领域。通过定性研究，可以产生新的概念，为复杂现象提供解释分析，甚至可以在疾病的诊治和预防方面发掘出新的方法，如通过定性研究研发新的量表或量表条目。结合定量研究能提升研究结果的论证强度。

单纯定性研究或定量研究均不能满足临床流行病学学科及科研发展的需要，定性与定量研究彼此有机结合，将逐渐应用于临床流行病学领域。结合临床流行病学特点，探寻定性研究在该领域的切入点，将有重要意义。

近年来已有很多学者关注、探讨如何将定性研究的方法移植并应用到临床流行病学中。

所谓的定性研究是指在自然环境中，研究者通过观察、访谈、文献分析等方法收集资料，对研究对象的精神主观世界如感受、观点、态度、行为和经验等非量化资料进行分析和研究。按一定的主题、类别进行编码、归纳概念，由此产生见解、知识、观点和理论，并对事物加以合理的解释。定性研究所得资料是对事件发生过程真实、详细的描述和引用研究对象经历、见解的文字性材料。

定性研究适合研究与人文和经验有关的现象或事物，其范围涉及疾病的病因、诊断、治疗、预后和预防等方面。可从不同视角探讨医生、护士、患者及卫生管理人员等对疾病的观点、态度、信念、动机、经验、体验等，观察医疗行为，为一些行为和态度提供合理的解释；有助于了解应用循证医学证据时可能遇到的障碍和临床决策时的局限；有助于研究者更好地理解患者的经历和主观感受，提高患者的依从性和研究的可操作性；促进临床证据在临床实践中的应用，

充分体现医学的人文关怀和以患者为中心的医疗模式的优势。

常用的定性研究方法包括以下几种：

(1) 观察法：指系统、详尽地观察研究对象在自然环境中的行为以及与周围的关系并加以记录。大致可分为两类：一是研究者参与到研究对象的活动过程中，其作为研究者的身份呈非公开状态；二是研究者的身份和研究行为在参与研究对象的活动过程中呈公开状态。研究者需要有目的、系统地如实记录和分析事件，也包括自身的感受和反应。观察法有助于研究者发现研究对象说与做之间的差异，补充访谈了解到的观点和态度与他们的实际行为之间存在的差异，也有助于发现研究对象自身没有意识到的行为习惯。

(2) 个人访谈：包括结构化、非结构化和深度个人访谈。结构化访谈是通过发放结构化问卷，询问一些答案有限定性的问题；非结构化个人访谈围绕几个核心问题展开；深度个人访谈只围绕一两个主题展开，但细节丰富。访谈中由访谈者引导和维持访谈。个人访谈中的问题应围绕研究目的，注意开放、中立和清楚。研究者的目的是了解被访谈者的认识和看法，或是被访谈者对某一词汇的内涵和外延的理解。个人访谈可以通过当时或事后的笔记/录音等加以记录。其优点在于与研究对象面对面直接交谈，了解研究对象对某些事物的感受、体验和看法，适合于在公开环境不便于讨论话题的深入探讨。

(3) 焦点组讨论：采用小组讨论的方法来促进和激发小组成员之间的讨论和交流，从而达到收集资料的目的。研究者的主要任务是组织、促进小组成员之间的互相讨论和交流，了解研究对象的交谈方式以及隐含于其中的态度和看法，发现不同研究对象对事物的认识和看法的异同。对于接受个人访谈有障碍时或访谈问题较特殊时，焦点组讨论可以彼此激发参与的热情和观点的表达。

此外，定性研究的方法还有文献分析法、Delphi法、群体决策法、共识法及案例研究法等。

定性研究过程主要包括研究目的或问题的确定、研究设计与抽样、资料收集和分析及研究报告的撰写。一般包括6类问题，即活动、行为、观点、知识、感觉及人口学资料。主要采用非概率抽样方法、常用目的抽样法。样本抽取遵循动态原则和饱和原则，即边收集资料边进行分析，当信息出现重复或饱和时，就停止观察或访谈。注重在自然情景下收集资料，研究策略更具灵活性与变通性，收集定性的非数据化的资料，资料分析方法采用归纳法。有多种定性资料分析软件可供使用，以“故事叙述”形式阐释结果。

定性研究在自然状态下进行，研究者深入到现场，作为现场情景中的一员，在自然环境中通过与研究对象展开直接的个人之间的接触来获得第一手的感性资料。关注研究对象自身的看法，尊重研究对象对自身行为的解释，从研究对象的角度去诠释研究对象行为的意义。定性研究的主要局限性是容易产生偏倚和代表

性差。由于定性研究多采取目的抽样，样本量不具备广泛的代表性，研究结果可能存在较大的变异性。其次，研究者就是资料分析的工具，研究者的主观性也会造成结果偏倚。在资料收集和分析过程中，可使用多种方法收集资料，比较不同方法的一致性，比较同一方法不同信息来源的一致性，比较不同分析人员审定分析结果的一致性，采用不同的观点和理论解释定性资料。

临床研究和临床实践的研究者与实践者及其对象是人，其复杂性不言而喻。对人体疾病的客观事实的研究方法已较深入且可定量，然而研究对象的主观世界在疾病的发生发展中的作用及其对诊断和（或）治疗及预防的影响目前常常难以定量和比较。同样，研究者的主观世界对诊断和（或）治疗及预防也有一定的影响，这是由主观方面的自身特点所决定的。有关主观方面的研究方法也不可能完全雷同于定量研究的方法，必须引入定性研究方法，才能较全面地反映人体疾病的面貌。定性研究的难点在于研究者和研究对象主观世界的丰富性和差异性及其合理处理，使研究的不确定性便于控制并将变异减至最小。现阶段可望取得突破的方向为学习、消化、吸收、引入社会学的方法，结合临床医学实际，参照精神心理研究方法，并与较成熟的定量研究方法进行有机的整合，建立较全面的临床研究方法，揭示疾病本质特别是主观方面在其中的作用、地位和意义。

参 考 文 献

方进博. 2008. 定量定性研究相结合在护理科研中的应用. 护士进修杂志, 23(1): 27～29

刘建平. 2008. 定性研究与循证医学. 中国中西医结合杂志, 28(2): 165～167

谢雁鸣, 廖星. 2008. 定性研究的主要方法及其在中医临床研究中切入点的探讨. 中医杂志, 49(6): 550～553

于河. 2008. 定性研究与肿瘤临床研究. 中国中西医结合杂志, 28(2): 169～171

钟继灿, 王健. 2007. 定性研究及其在卫生项目评价中的应用. 卫生软科学, 21(1): 47～49

Brazil K, Cloutier MM, Tennen H, et al. 2008. A qualitative study of the relationship between clinician attributes, organization, and patient characteristics on implementation of a disease management program. Dis Manag, 11(2): 129～137

Gregory DM, Way CY. 2009. Qualitative research in clinical epidemiology. Methods Mol Biol, 473: 203～215

Haynes RB, Ackloo E, Sahota N, et al. 2008. Interventions for enhancing medication adherence. Cochrane Database Syst Rev, 16(2): 101～110

Wensing M. 2008. Research methods from social science can contribute much to the health sciences. J Clin Epidemiol, 61(6): 519～520

撰稿人：朱　樑　顾明君
第二军医大学

传染病季节波形的预测价值

Predictive Value of Seasonal Type of Infectious Disease

传染性疾病的发生和流行受到传染源、传播途径、易感人群三个环节和自然因素、社会因素两个因素的影响。数理预测方法已经广泛地应用于气象、地震、工农业等各个领域。国内外专家开展了大量关于疫情预测的研究工作，疾病控制工作人员和学者一直试图通过对既有资料的分析、归纳和总结，提出有价值的传染病预测指标和模型。传染病季节波形是指传染病发病率随时间变化的分布图形。在我国2004年实行法定传染病网络直报之前，我国学者通过资料分析发现，传染病季节发病曲线波形的左右偏移程度与下一年发病率的升、降存在关联，波峰右偏则下一年的发病率上升的可能性大，且向右偏移程度越大，上升的概率越大；反之则发病率下降的可能性大。这一观点得到了国际同行的关注和认可，在实现传染病网络直报的情况下研究和探索传染病发病曲线波形的预测价值对于防控相关疾病具有重要意义。

传染病季节发病曲线波峰的偏度在一定程度上综合反映了众多因素对传染病流行过程的影响。有些影响因素本身会因惯性持续到下一流行年，从而对下一流行年的发病产生影响。发病高峰左偏，说明流行年后期与早期相比，疾病的发生渐趋弱势，此时虽然季节因素还存在，但其他影响因素已减弱，这种趋势可能持续到下一年而使下一流行年的发病危险减小。在使用传染病季节发病波形理论对我国1975～1991年的24种甲、乙类传染病资料分析后，发现该理论对于呼吸道传染病和病毒性传染病，特别是对病毒性肝炎、百日咳、流行性脑脊髓膜炎和猩红热等具有较大的预测价值。

在使用1975～1996年全国疫情资料，建立了麻疹、猩红热两种疾病1975～1995年、1980～1995年、1985～1995年和1990～1995年4个不同长度的时间序列，构建外推模型进行预测研究后发现，在上述两种疾病4个时间序列共236份资料中，98.3%的资料支持在传染病疾病流行过程中传染病波形的预测价值。随着时间序列的延长，预测与实际符合的比例增大，说明其与时间序列长度有关。在麻疹疫苗广泛使用后，除了在少数接种率不高、冷链不健全的地区外，麻疹平均发病年龄有后移趋势，使得年龄构成对疾病的流行规律产生影响。而大部分猩红热患者表现为轻型与不典型的临床经过，且早期应用抗生素，不能产生典型发疹，从而造成诊断上的困难，出现相当数量的漏诊。与麻疹比较起来，由于

猩红热不是计划免疫疾病，流行规律受人为因素影响相对较小，说明传染病波形的预测价值与病种也存在相关性。传染病发病曲线季节波形现象在辽宁省1950～2002年猩红热疫情资料研究中得到了进一步验证。另外一项对1970～1999年细菌性痢疾和病毒性肝炎疫情资料的分析研究也证实传染病波形存在于两种疾病的流行过程中。

要进一步考虑的是，在利用传染病发病季节曲线波形现象建立模型时，采用流行年而非自然年的方式重新排列有关疫情的时间序列资料，并以此确定流行起止月份，从而使资料的时序符合疾病自身的规律性；综合应用传染病疫情年、月报的时间序列资料，建立模型预测发病趋势；所使用的传染病季节分布的月累计百分位数作为自变量，是在流行病学分析的指导下，使用一系列的特定方法从疫情数据中提炼出来的；根据资料本身的信息含量，实事求是地把应变量简化成预测把握较大的升降两种趋势。使用既有资料对传染病进行预测，距离下一流行年的高峰存在时间间隔，为开展相应的防控措施提供了时间。

客观上存在的疫情报告的漏报、误诊等问题无形中会影响人们对疫情资料进行深入的研究。任何传染病现象都处于不断发展和演变的过程中，难免会存在或涉及不可预知或不可测量的变量，使得建立的模型不再适用或者分析预测价值降低。我国的传染病直报系统从建立运行到现在，时间较短，应用传染病发病季节曲线波形现象进行分析预测存在一定的难度。

对于目前的传染病直报系统的疫情数据，除了通过进行监测发现异常，及时进行调查、处理和干预措施评价外，还可以考虑对传染病波形现象建立模型，并进行修正和改进，使之能够适应传染病上报模式的变化，发挥其预测预报作用。另外，可尝试将多种预测方法结合进行分析预测，以期更系统、全面地反映现象的规律性和未来趋势。

在目前的情况下，应使用获得的数据开展进一步分析。对于该方法在怎样的范围内对何种传染病具有更大的预测价值以及如何调整完善，值得进一步进行研究。

参考文献

程颖恺，曾光．1999．麻疹、猩红热流行中存在“Z-D现象”的进一步论证及其预测价值研究．中华流行病学杂志，20(4)：200～203

李丹，周宝森．2004．传染病季节流行现象预测猩红热疫情．中国公共卫生，20(6)：660～661

徐元勇，刘慧慧，宋宏彬，等．2008．应用“Z-D现象”对军队麻疹疫情的预测研究．中华疾病控制杂志，12(6)：598～600

曾光，丁雁鹏，程颖恺．1997．传染病流行中存在“Z-D现象”的论证．中华流行病学杂志，18(5)：270～274

张岚．2002．应用“Z-D现象”进行传染病疫情预测的研究．数理医药学杂志，15(3)：268～269

G Zeng ,SB Thacker ,Z Hu ,et al. 1988. An assessment of the use of Bayes' theorem for forecasting in public health :the case of epidemic meningitis in China. Int J Epidemiol ,17(3):673～679
Iram Longini ,Paul Fine ,Stephen Thacker. 1986. Predicting the global spread of new infectious agents. American Journal of Epidemiology ,123(3):383～391

撰稿人：曾　光
中国疾病预防控制中心

感染性因素如何导致慢性“非传染性”疾病

What Is the Relationship Between Infectious Factors and Chronic Non-communicable Disease

在全球工业化和城市化的进程中，随着经济和社会的发展以及抗生素和疫苗的发明与广泛应用，一些传染性疾病的发生和流行得到了有效的控制。肿瘤、冠心病、脑卒中、糖尿病、精神分裂症、阿尔茨海默病等慢性“非传染性”疾病的发病率和患病率不断上升，死因顺位也不断提前，给患者、家庭和社会带来沉重的负担。随着我国老龄人口所占比重的不断增加，我国正在步入老龄化社会，治疗各种慢性病所消耗的医疗和社会资源也在增加，探索和研究慢性病发病过程中所涉及的感染性因素及其作用，提出和采取针对性治疗和干预措施，有利于促进我国公众健康和社会发展。

科学技术的进步为人类认识世界提供了有力的支持，科学家从来没有怀疑和感染性因素有关联的疾病。经过研究证实一些疾病和病原微生物相关，例如由幽门螺杆菌引起消化性溃疡，人乳头状瘤病毒（HPV）引起宫颈癌，乙型和丙型肝炎病毒导致肝细胞癌。然而，证明感染性因素与慢性病的关联存在很多难点：由于病原体离开了原发的复制增殖器官，或者疾病在病原体感染过程之后一段时间后才发生，这就使得科赫（Koch）原则不能适用于判定病原体与慢性疾病的关系。另外，现有的血清学检测、病原体分离培养、聚合酶链反应（PCR）、免疫组化、微点阵分析等方法由于敏感性等原因，如果未能从人体的组织中分离培养到病原体，或者未能发现病原体的蛋白质或者核酸成分，并不能作为没有感染病原体的证据。证实广泛存在的感染与慢性疾病的关系也是困难的，例如很多人感染 EB 病毒，其中只有很少的一部分会继发肿瘤，这就需要同时考虑遗传基因和环境暴露。包括慢性疲劳综合征和精神分裂症在内的疾病，由于很难精确地认定患者所患的确切疾病，缺乏相应的生物标志物，导致难以发现病原体与疾病的关联。由于难以对诸如脑组织和冠状动脉这样的组织进行采样，通过检验的方式发现个体是否感染是困难的。对于在类似肠道这样的非无菌环境中，难以识别某一微生物或者一组微生物与慢性病的关系。

病原体可以通过在患病组织或器官的持续感染导致慢性疾病，人乳头状瘤病毒在感染过程中可以进入宫颈细胞，并将基因整合到受感染者染色体中，引起正常细胞分裂过程发生变化，导致不能控制的分裂，进而细胞性状转化，形成肿

瘤。受感染者对乙型肝炎病毒感染的免疫应答引起疾病的发展，慢性的肝脏感染会引起瘢痕形成、纤维化和肝硬化，将导致肝功能衰竭。对受感染者DNA的过氧化损伤、病毒DNA的整合及类似黄曲霉毒素这样的环境毒物的影响可以导致细胞性状转化，性状转化的细胞在病毒的刺激下替代了被免疫应答杀灭的肝细胞，形成肝脏肿瘤。感染卡波西（Kaopsi）肉瘤相关疱疹病毒（KSHV）引起受感染者的自分泌和旁分泌反应，产生的异常细胞不仅影响组织中受感染的细胞，还会影响未受感染的细胞。一些病原体通过引起具有遗传易感性的受感染者的免疫反应而导致慢性疾病的发生，易感个体出现的免疫反应或者过于强烈导致组织的自我破坏，或者不足以清除病原体。一些疾病是在感染过程结束后才发生的，例如瑞特（Reiter）综合征。病原体还可以通过干扰肿瘤抑制机制直接致癌，引起炎症产生肿瘤的内环境，可以抑制细胞分裂，引导受感染者蛋白质结构改变，产生免疫抑制，以及直接以细胞为目标影响细胞的活动和生长。

病原体的特点对慢性疾病会产生影响，病毒将自身基因信息整合到受感染者染色体的能力会决定该病毒是否会对宿主产生长期的影响。病原体在感染宿主一段时间以后才引起疾病发生的产生潜伏期的能力，是其成为慢性疾病病因的一个要素。病原体应具有附着于黏膜或其他组织的能力。病原体在免疫系统的作用下转变和伪装自己的能力是避免被宿主免疫系统杀灭的重要特点。病原体的免疫逃逸能力决定了其是否能够存在足够长的时间以引起疾病。

目前，已经有充分证据证明多种病原体与慢性疾病有关，例如人类嗜T细胞Ⅰ型病毒与成人T细胞白血病和热带痉挛性截瘫相关；人乳头状瘤病毒与宫颈癌、喉乳头瘤、阴茎癌、肛门癌、外阴和阴道上皮肿瘤、头颈癌有关联；细小病毒B19与贫血、关节炎有关联；朊病毒与克-雅病、库鲁（Kuru）病、家族性失眠症有关联。另外，怀疑某些疾病与感染性病原相关，例如间皮瘤与猴病毒40，多发性硬化症与EB病毒，阿尔茨海默病与肺炎衣原体，糖尿病与肠道病毒，动脉硬化与肺炎衣原体、巨细胞病毒，精神分裂症与子宫内暴露流感病毒，肥胖与肠道细菌等。

已经证明流行病学是识别病原体和慢性疾病因果关系的重要工具，比较受感染人群和未受感染人群发生慢性疾病的危险性，为研究病原体作为诱因的疾病病因提供了强有力的支持。除了流行病学家之外，需要生物信息学、影像学、遗传学、微生物学、临床、统计学、免疫学、公共卫生和病理学等方面专家的合作，多领域共同研究，开发病原体芯片等新的检测技术，构建类似于循证医学多中心联合实验形式的包含病原体与慢性疾病联系的数据库，例如，采用非传统的抗生素疗法治疗慢性疾病取得良好效果的证据。应积累更多的相关数据和病理及活检标本，发现更多的与慢性疾病相关的感染性因素，开发疫苗，采用抗生素进行治疗，以提高人们的生活质量和健康水平。

当前我国可以针对国外已经有明确证据证明和传染性因素有关的慢性病，使用我国所积累的数据加以确认，根据防治结合的原则开展研究。结合我国的实际情况，在验证存在因果关联的基础上开展探索性研究，推动相关感染性因素和慢性病的关系方面研究的进展。

参考文献

Awady Mk, Kaplan JB, O'Brien SJ, et al. 1987. Molecular analysis of intergrated human papillomavirus 16 sequences in the cervical cancer cell line SiHa. Virology, 159(2): 389～398

Kemple K, Bluestone R. 1977. The histocompatibity complex and rheumatic diseases. Med Clin North Am, 61(2): 331～345

Kendo Kiyosawa, Takeshi Sodeyama, Eiji Tanaka, et al. 1990. Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody of hepatitis C virus. Hepatology, 12(4): 671～675

Marshall BJ, Warren JR. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet, 1(8390): 1311～1315

Matej Bajzer, Randy J Seeley. 2006. Physiology: obesity and gut flora. Nature, 444: 1009～1010

Meisels A, Roy M, Fortier M, et al. 1981. Human papillomavirus infection of the cervix: the atypical condyloma. Acta Cytol, 25(1): 7～16

Peter J Turnbaugh, Ruth E Ley, Michael A Mahowald, et al. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature, 444: 1027～1031

Sherman M, Shafritz DA. 1984. Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma: molecular biology and mechanistic considerations. Semin Liver Dis, 4(2): 98～112

Staskus KA, Zhong W, Gebhard K, et al. 1997. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression in endothelial (spindle) tumor cells. J Virol, 71(1): 715～719

撰稿人：曾　光
中国疾病预防控制中心

后基因组时代的流行病学分析策略

Epidemiological Analysis Strategy in the Post-genomic Era

随着社会、科学的发展和技术的不断进步，特别是针对大量物种的基因组测序计划的完成，采用表达谱分析、蛋白质组和代谢组分析所进行的流行病学研究越来越普及，为更宏观、全面和深入的当代流行病学研究提供了可能。但如何实现对海量数据及数据间静态和动态的复杂关系分析使现代流行病学面临前所未有的挑战，因为传统的流行病学分析模式尚没有做好相应的准备；当前的分析策略、分析理论和分析软件不足以完成对相关信息的有效分析，如果不纳入流行病学的分析策略，基因组及后基因组数据即便获得了，也仍然是一堆“天书”，很难用于全面分析生命现象的巨大复杂性。如何建立适应后基因组时代的流行病学分析策略已经成为一个世界性难题。

1662 年，英国的格朗特（John Graunt）首次利用英国伦敦一个教区的死亡数据进行了死亡分布及规律性研究，这被认为是流行病学研究雏形的开始。在 18 世纪末至 20 世纪初的大约 200 年时间里，不断由传统的调查分析扩展为定量与定性相结合、宏观与微观结合，形成了传统流行病学分析策略。20 世纪 40 年代以后，流行病学研究进一步扩展到非传染病领域，通过对混杂和偏倚的区分，交互作用以及病例对照研究设计策略的引人，并通过与其他学科交叉融合，形成了现代流行病学分析策略。1986 年 3 月，杜伯克在美国《Science》杂志上发表了一篇题为《癌症研究的转折点：人类基因组》的文章，指出科学界面临两种选择：要么从人类基因组中“零敲碎打”地分析和研究几个肿瘤相关基因，要么对人类基因组进行完全测序。其观点对流行病学分析策略的调整具有划时代意义。2000 年 6 月 26 日，人类基因组工作草图完成，标志着后基因组时代的真正来临。所有人类基因组数据不允许专利保护，但当某个基因的确切功能被彻底搞清楚时，研究者就可以就该基因申请专利。后基因组时代的研究和分析能力在很大程度上将决定一个国家在未来生物医学领域的国际地位和在产业发展中的话语权。

从基因组构成特征，以及在转录组、蛋白质组等后基因组水平上进行分析，获得能反映生命现象整体、群体甚至动态的信息，构成了后基因组时代流行病学分析前所未有的客观、全面、海量的信息来源。这些研究指标不论在的数量还是质量上都是以往流行病学研究中不可想象的，也为流行病学研究带来广阔的应用

空间，如近年来国际上从对肿瘤的认识入手进行了此类探索。但如何建立蛋白质组、糖组、代谢组等不同后基因组层面的关联分析？如何处理基因结构特性，包括大量的单核苷酸多态性（SNP）与不同条件下的表达谱特征分析？如何完成在群体水平和个体水平的后基因组信息与疾病和健康的关系分析？进而为生命现象的认识、疾病的预防策略建立、个体化医疗和循证医学的实施，以及新的药物和疫苗靶点的筛选提供方法学的支撑，是当代流行病学分析策略面临的主要挑战。

后基因组时代的流行病学分析策略，应充分考虑到生物信息学的高速发展和算法不断改善的现状，以及利用计算机模拟所获得的理论数据；还需要经过实际验证和修正等，将流行病学的分析理念和需求主动融合到功能基因组研究等跨学科研究领域，强化实验室分析能力与传统流行病学的融合，打破仅能将比较基因组学或差异蛋白质组学等部分信息应用到流行病学设计和分析的局面，充分利用后基因组时代所能获得的海量的动态生命活动信息，发展与之相适应的流行病学分析策略，即系统生物学流行病学分析策略，这是一种必然趋势。系统生物学是研究一个生物系统中所有组成成分（基因、基因组和元基因组、mRNA、蛋白质、糖和脂类等）的构成，以及在特定条件下这些组成成分间的相互关系的学科，是后基因组时代对生物学研究的最高层次。系统生物学流行病学分析策略将作为后基因组时代流行病学分析策略的特征，在根本上区别于以往的传统流行病学分析，并初步在肿瘤和神经系统复杂生物现象分析中获得突破性进展。系统生物学流行病学分析策略的变化也会体现在流行病学方法等方面，如针对基因组和宏基因组分析的循证荟萃分析（genome search meta analysis，GSMA）方法等，而迅速发展的“云计算”能力的提升将为此类分析策略的突破提供关键的技术支持；从小规模数据量处理向大规模数据量处理转换时，往往并非算法上的改进能做到的，建立在启发式分析方法基础上的分析策略有望成为新的突破点。

针对预防医学和临床医学所关注的海量生物信息的分析需求，所构建的后基因组时代的系统生物学流行病学分析策略，将使流行病学分析在对生命的个体、群体及其相关因素以全面、完整和动态的方式展开，可以获得全面的公共卫生决策信息，用于公共卫生措施的实施和全民健康策略的制订。对个体与群体、基因易感性与外部暴露因素等进行全面分析，对疾病与健康的认识、药物与疫苗的发展、公共卫生决策与评价意义巨大。

参考文献

Dulbecco RA. 1986. Turning point in cancer research: sequencing the human genome. Science, 231: 1055～1056

Geschwind DH, Konopka G. 2009. Neuroscience in the era of functional genomics and systems biology. Nature, 461: 908～915

Gunawardena J. 2010. Systems biology :biological systems theory. Science ,328 :581～582

Hood L ,Heath JR ,Phelps ME ,et al. 2004. Systems biology and new technologies enable predictive and preventative medicine. Science ,306 :640～643

Venter JC ,Adams MD ,Myers EW ,et al. 2001. The sequence of the human genome. Science ,291 : 1304～1351

Wild CP ,Law GR ,Roman E. 2002. Molecular epidemiology and cancer :promising areas for future research in the post-genomic era. Mutat Res ,499 :3～12

撰稿人：张建中
中国疾病预防控制中心传染病预防控制所

疫苗可预防疾病防控策略的综合评价

Comprehensive Assessment of Control Strategy of Vaccine-Preventable Diseases

随着疫苗技术的发展和新型高效疫苗的不断推出，疫苗可预防疾病的范围不再限于传染病领域，已涉及肿瘤等慢性病防治领域。据世界卫生组织（WHO）的资料，每年至少有 200 万人死于 WHO 推荐的疫苗可预防的疾病，另有 210 万人死于预期不久可获得疫苗的疾病（如轮状病毒、肺炎球菌和脑膜炎球菌等所致疾病）。成人中癌症死亡的两个主要原因（肝癌和宫颈癌）现可通过乙肝疫苗和人乳头状瘤病毒疫苗予以预防。

虽然大量资料表明，对于疫苗可预防疾病的防控，使用疫苗是一种最为经济有效的手段，但疫苗可预防疾病的防控策略是综合性的。策略的制订要综合对疾病的危害分析、相关国家和地区的经济、社会和科学技术发展条件等诸多因素；要保证疫苗的使用效果，必须在适当的时间、通过恰当的方式应用于适当人群。如何开展对疾病的危害程度、易感人群、疫苗或相关干预策略使用的卫生经济学，以及政策支持和经费保证情况等多个方面因素进行综合评价，对疫苗可预防疾病的防控策略的实施和调整具有决定性意义，是首先要解决的关键科学问题。在制定防控策略的同时，如何客观全面地对疫苗可预防疾病防控策略进行综合评价是一个世界性难题。

综合评价体系的建立需要依据多种监测和分析能力的有机组合才能实现。由于不同国家、不同地区人群病原体的流行强度和菌毒株型别可能存在明显的差异，疫苗所针对的应用人群对同一疫苗的免疫效果也可能差异显著。某种疫苗在特定人群所取得的资料很可能不具有普遍意义，是否被推荐使用必须建立在严格的前期综合评估的基础上。疫苗策略一旦实施，特别是进行了大规模人群疫苗预防接种的，一旦出现问题，将是广泛性的问题，需要系统的分析方法进行评价，力争早期发现问题或发现隐患。但目前的评估过程普遍有两个根本问题没有解决：一是评价用信息不完整，只能用于说明诸如疫苗有效性、安全性等某些问题；二是无法同时完成对多种疫苗可预防疾病的综合评价，进而提升公共卫生资源的使用效率。

以上问题的出现，主要归因于两类难点问题没有很好地解决：其一，进行疫苗可预防疾病防控策略的综合评价，需要经济、社会、管理、医疗与疾控部门的

有效合作，并建立一个具有灵敏度和及时性的监测和检测网络，目前尚不具备；其二，随着所涉及的病种数量扩大和使用疫苗种类增加，评价检测指标的工作量和所需样本量急剧加大，传统的评价思路和实验室检测方法在检测所需工作量和所需样本量等方面已无法承受。如何实现基于微量样品高通量分析的疫苗可预防疾病的疾病负担评估、人群易感性分析和疫苗使用效果评价成为综合评价体系中的一个不能回避的科学难题。

多年来，各国对疫苗可预防疾病的防控策略进行过多种评价，其中最具代表意义的是中国 2006 年组织开展了乙肝血清流行病学调查，了解和分析我国不同地区、不同年龄人群乙肝病毒表面抗原（HBsAg）携带率和乙肝病毒感染率，14 岁（含）以下人群乙肝疫苗接种率；采用成本效益和成本效果分析指标评价 1992 年我国乙肝疫苗纳入儿童计划免疫管理的免疫预防策略的经济效果；构建我国乙肝疫苗免疫预防效果评估决策树模型。我国新生儿乙肝疫苗免疫策略使得 1992～2005 年出生新生儿累计避免发生乙肝病毒（HBV）感染 6522.95 万例，每预防 1 例 HBV 感染的费用为 81.99 元，总计可获得 2674.77 亿元的净效益，效益成本比为 51.01∶1（城市为 49.59∶1，农村为 51.91∶1），认为我国新生儿乙肝疫苗免疫策略实施 14 年获得巨大经济效益，决策树模型应用于乙肝疫苗接种效果评估具有定量决策和综合多因素等优点。此次评价中，还对 14 岁（含）以下人群不同年龄、不同地区麻疹和白喉免疫水平进行了分析，开展了对几种疫苗可预防疾病策略的评估工作。欧美等国也曾对肺炎球菌病等的危害、治疗与预防策略进行评价，对疫苗可预防疾病不同年代的比较及影响因素进行综合分析。但到目前为止，综合评价的技术瓶颈问题均没有很好地解决。

为解决疫苗可预防疾病防控策略的综合评价中的关键问题，国内外均在进行尝试：一方面，试图通过建立全国性的疫情直报网络和病原体监测网络，构建具有代表性的评价信息来源平台和样品收集平台。由于我国在传染病网络直报系统和网络实验室建设等方面已经具有良好的基础，通过资源整合并建立针对性的人群布点、样品采集和样品检测基地体系，综合评价所需要的支撑体系将会建立。另一方面，通过诸如多病原分析基因芯片和能覆盖数百种以上特定抗原抗体靶点的蛋白芯片的使用，解决样品用量的瓶颈和高通量平行分析问题。以上探索近期进展迅速，但还必须通过以上两个方面的有机整合，甚至包含政策法规层面的配合，才能使疫苗可预防疾病防控策略的综合评价问题有所突破。

此问题的解决，将有助于根据疫苗可预防疾病的具体情况和变化，科学确定和调整疫苗的覆盖病种和使用策略，在使用有限医疗资源的前提下，达到更好的防控效果。

参考文献

党如波,张顺祥,张卫东,等. 2009. 中国新生儿乙肝疫苗免疫效果评估. 中国公共卫生,25(4):385～387

Bloom DE,Canning D,Weston M. 2005. The value of vaccination. World Economics,6:15～39

Liang X,Bi S,Yang W,et al. 2009. Epidemiological serosurvey of hepatitis B in China-declining HBV prevalence due to hepatitis B vaccination. Vaccine,27(47):6550～6557

Mufson MA,Oley G,Hughey D. 1982. Pneumococcal disease in a medium-sized community in the United States. JAMA,248:1486～1489

Omer SB,Salmon DA,Orenstein WA,et al. 2009. Vaccine refusal,mandatory immunization,and the risks of vaccine-preventable diseases. N Engl J Med,360:1981～1988

Plouffe JF,Breiman RF,Facklam RR. 1996. Bacteremia with *Streptococcus pneumoniae*:implications for therapy and prevention. JAMA,275:194～198

Roush SW,Murphy TV. 2007. Historical comparisons of morbidity and mortality for vaccine-preventable diseases in the United States. JAMA,298:2155～2163

撰稿人：张建中

中国疾病预防控制中心传染病预防控制所

碘缺乏病发病影响因素

Influencing Factors in the Development of Iodine Deficiency Disorders

碘是人体不可缺少的微量元素之一，与人体生长发育关系密切，缺乏时会导致以脑发育和生长发育障碍为主的一系列的损伤，称为碘缺乏病（iodine deficiency disorders，IDD)。IDD 是全球性公共卫生问题，全世界受 IDD 影响的国家达到 130 个，近 22 亿人口受到 IDD 的威胁。IDD 不仅给个体，也给家庭和社会造成沉重的疾病负担。相关研究证实，碘缺乏可使人群的平均智商降低 10%～15%。地方性克汀病（endemic cretinism ）是 IDD 最严重的可见性疾病结局之一，由于患者的神经系统受到不可逆损伤，基本丧失劳动能力。根据 20 世纪 90 年代 WHO 的统计，全球地方性克汀病患者有 1120 万之多，中国是受 IDD 威胁最严重的国家之一。

1995 年我国开始实行全民食盐加碘（universal salt iodization，USI）的策略，在 IDD 的防治上取得了令世人瞩目的成绩。全国 IDD 监测表明，我国以省为单位实现了基本消除 IDD 的阶段目标，并实现和保持了可持续消除 IDD 的进程。但是，我国防治碘缺乏病任务还十分艰巨，截至 2008 年底，全国还有 4 个省（区）未达到基本消除碘缺乏病的目标，西部部分省的局部地区仍然有新发克汀病病例。

普遍认为 IDD 的病因是明确的，主要是因为外环境持续缺碘导致机体长期碘摄入不足所致，而且通过食盐加碘，IDD 得到了有效控制，但回顾 IDD 防治研究的历程，还存在许多科学上的困惑。外环境缺碘导致机体碘摄入量不足是 IDD 发生的主要病因，但在实践中，许多现象反映出还有其他的因素在 IDD 中起了重要的作用，如遗传因素、营养因素和环境因素等。目前，碘缺乏是如何导致人体一系列损伤的机制还不十分清楚。地方性克汀病被国内外学者广泛认可的主要原因是胚胎期和新生儿期严重缺碘所致，但仍然有争议：①虽然国内外学者对地方性克汀病的发病机制进行了一些科学研究并做出推理，但这些研究还不完善。②多数学者主张地方性克汀病是由于胚胎期严重缺碘所致，但同样严重缺碘的地区并不一定都会发生地方性克汀病。一些地区外环境严重缺碘但无 IDD 流行或病情很轻，更无克汀病发生，如我国西藏、青海和内蒙古的牧区，膳食综合营养素的摄入和居民生活方式可能对碘缺乏病的发生存在较大影响。③同一村寨中，克汀病的发生具有家庭聚集现象，因此一些学者提出可能存在碘外致病因素，如致甲状腺肿物质、遗传因素及自身免疫因素等，与地方性克汀病发病有

关。研究表明，除环境持续缺碘，导致胚胎和新生儿碘摄入严重不足是地方性克汀病发生的主要因素外，遗传因素和其他环境因素也对地方性克汀病的发生有一定的影响。在基因研究方面，有研究报道克汀病伴随促甲状腺激素（TSH）、生长激素和催乳素缺乏的发生与 Pit-1/GHF-1 基因突变有关。还有人报道 TSH 信号级联的变化，尤其是 TSH 受体和刺激 G-蛋白-α 亚单位的基因突变与功能异常有关，可能与甲状腺自体细胞的遗传变化和甲状腺结节生长因子过度表达有关。也有研究表明载脂蛋白 E（Apo E）的 E4 等位基因频率在患儿组明显高于对照组，因此推断 Apo E 的 E4 等位基因可能是胎儿碘缺乏病的遗传危险因素，这为深入研究地方性克汀病的遗传危险因素提供了线索。

随着碘盐的普及、人们生活水平的提高和生活方式的改变，影响 IDD 发生的因素可能更加隐匿。表面看 IDD 已经消除，但发病相关因素还不十分清楚，问题仍然存在，可能会在一定条件下死灰复燃。目前取消全民食盐加碘的呼声很高，将来可能在一些发达地区实行碘盐和非碘盐自愿选择，目的是减少普及碘盐可能带来的甲状腺疾病发病率的升高，但这样做必然会增加个体碘缺乏的风险，特别是对于孕妇和胎儿。与此同时，西部碘缺乏严重地区由于种种原因还吃不到碘盐，新的克汀病患儿还在出生。因此，开展碘缺乏病发病影响因素的研究是必要的，从科学上真正揭示碘缺乏病的发病机制，制定科学的防治策略和措施。

碘缺乏病发病影响因素的研究难点在于：碘的摄入、在体内的储存和代谢等过程非常复杂，到目前仍然没有完全阐明，同时克汀病研究现场和患者越来越少，完整的家系随着时间的推移已经很难找到；此类研究需要采用流行病学、组织病理学、胚胎学、基因和分子生物学等方面的方法和技术；同时，基础研究与流行病学研究必须紧密结合，才能彻底阐明碘缺乏病发生的相关因素，从而针这些因素采取相应的防治措施，使碘缺乏病这一严重影响我国国民素质的疾病不再发生。

总之，即使对于一个病因明确的疾病，其影响发病的因素也是复杂的。研究这些因素有利于科学的公共卫生政策的制订，有助于疾病的综合防治，特别是对碘缺乏病这样一个需要长期甚至永远实行人工干预的疾病更是必要。

参考文献

陈祖培.2002.对全民食盐加碘防治碘缺乏病的评价.国外医学·内分泌分册,22(4):268～271

马泰,卢倜章,于志恒.1993.碘缺乏病——地方性甲状腺肿与地方性克汀病.北京:人民卫生出版社,75

马泰.2002.全民食盐加碘的国策应该坚持.中华内分泌代谢杂志,18(5):339

阎玉芹,陈祖培.1997.地方性克汀病病因及发病机理的研究进展.中国地方病防治杂志,

6(5):222～225

Halpem J. 1989. Neurological aspects of cretinism in Qinhai province. In: Iodine and the Brain. New York: Plenum Press, 39

Hoermann R, W Uadbeck B. 1998. Course of thyroid nodules. Exp Clin Endoc Rinol Diabetes, 106(4):27～28

Tatsumi K. 1992. Cretinism with combined hormone deficiency caused by a mutation in the PIT 1 gene. Nat Genet, 1:56～58

Wang HY, Zhang FC. 2000. Apo lipoprotein E is a genetic risk factor for fetal iodine deficiency disorders in China. Mol Psychiatry, 5:363～368

撰稿人：李素梅　谷云有
中国疾病预防控制中心传染病预防控制所

百年医学悬案：克山病病因之谜

The Origin of Keshan Disease

克山病是一种原因不明的以细胞线粒体损害为早期病变特征的地方性心肌病，因1935年冬在黑龙江省克山县农区暴发时首次被发现而命名，但类似病症早在100年前就有文字记载。此病广泛分布在中国从东北到西南的一条狭长地理区域，跨越黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古、河北、河南、山东、山西、陕西、甘肃、西藏、贵州、湖北、重庆、四川和云南，这一地带土壤贫硒、气候湿冷。

按心脏功能和病程，临床上将克山病划分为急型、亚急型、慢型和潜在型四种类型，各型之间可以互相转化。克山病流行病学和病理学特征是病因作用的外在表现。流行病学上表现为明显的地区性、人群选择性、年度与季节高发性和短期集中发病的特点。病区呈灶状，主要分布在丘陵地带，也有一些病区包围某个非病区的“健康岛”；在人群分布上，主要危害自产自给的农业人口，尤其是贫困户和新移民户的生育期妇女及断乳后至学龄前儿童，约1/3病例呈家庭聚积性；高发年常受自然因素和社会经济因素影响，缺乏固定的周期性规律；虽然全年均可发病，但急型和亚急型的发病呈明显的季节性，北方病区急型克山病多发生在寒冷的冬季，西南病区小儿亚急型克山病多发生于夏秋梅雨时节。病理上，克山病主要累及心脏，病变通常左心室及室间隔较右心室重，心肌内层、乳头肌和中层重于外层，表现为心肌严重的变性、坏死和纤维化修复。除极少数病程较短的急型或没有心功能障碍的潜在型外，心脏均有不同程度的扩大，大者可达正常心脏的2～3倍以上，尤以慢型为重。其他脏器的改变多属继发或并发。克山病心肌病变无特异性，但具有一定特点：心肌坏死灶成批发生，沿血管播散分布，常见新旧病变共存，坏死灶内有程度不等的间质炎症，属于吞噬吸收反应。

克山病病因复杂而且隐匿，经过70多年各学科的努力探索，先后提出十几种主要病因假说，目前受到重视的是营养地球化学说与生物性病因说。

营养地球化学说认为，克山病病因存在病区水土之中，通过食物链作用于人体。20世纪70年代以来的一个重要进展是发现克山病与生活环境低硒密切相关，补硒可以有效预防急型和亚急型克山病发生。但硒缺乏程度与克山病消长规律并不一致，因此普遍认为硒可能参与克山病的发病过程但不是“始动”致病因子。

生物性病因说则认为，由于克山病的某些流行病学特点，如病区多分布于适

合生物群落繁殖的山区和丘陵地带，急型、亚急型克山病的年度多发与季节多发等现象易于用生物因素解释。在生物性病因假说中有两种代表性的观点：一种主张是肠道病毒感染，另一种主张是粮食霉菌毒素污染中毒。肠道病毒感染的观点主要来源于对西南病区小儿亚急型克山病合并肺炎的观察，但北方病区少见。近年来，Beck 等的研究表明，低硒或低维生素 E 条件喂养的小鼠注入无致病作用的 CVB3/0 可突变为有毒株，导致心肌损害。这个新奇发现激发了学术界对病毒病因研究的更大兴趣。与此不同，郭可大对病区进行了长期观察并综合其他学说精华，在 20 世纪 60 年代提出真菌毒素中毒假说。随后，其他研究小组分别对串珠镰刀菌素、T-2 毒素、丁烯酸内酯和黄绿青霉素进行了毒性鉴定，其中获得支持性证据较多的是黄绿青霉素。

以上诸学说虽然各持有据，但在一些重要环节上存在空白或明显缺欠，不能圆满解释克山病的所有现象，因此有学者提出复合病因的可能，那么谁是元凶呢？克山病病因悬而未决，一方面可能是研究者思想方法存在问题，盲人摸象、争论不休；另一方面是海选并鉴定具体的致病物质需要时间。在克山病大流行年代，防治工作的重点是抢救患者、控制病情，对病因关注的精力有限。随着生活改善和防治措施落实，病区患者越来越少，给病因求证增加了难度。然而，病因研究最大的难点在于正确解读克山病流行病学提示的生物性病因与病理学提示的化学性病因之间相互矛盾的现象。

根据克山病的流行病学特征，从战略上缩小研究范围、找出致病途径并不难。目前可以确定的是主要致病物质仅存在于病区自产粮食中。克山病作为一种典型的地方病，可排除非地方性因素如单纯营养缺乏、饮水等。另外，生物性病因中传染性因子的可能性也不大。从目前获得的证据推断，真菌毒素慢性中毒的可能性最大。接下来的大量工作是从病区病户自产粮食中筛选具有心肌毒性、分子靶标是细胞线粒体的生物毒素。我们相信，未来病因研究者只要沿着正确方向“顺藤摸瓜”，一定会取得突破性发现。

参 考 文 献

郭可大. 1986. 三十年来克山病病因真菌毒素中毒学说的研究概况. 医学研究杂志, 10: 289～294

李刚. 1982. 第三次全国克山病病理及发病机制专题会议概况. 医学研究杂志, 6: 20～21

杨福愉, 林治焕, 李生广, 等. 1987. 克山病是一种心肌线粒体病. 实验生物学报, 20(4): 473～485

杨光圻, 王光亚, 殷泰安, 等. 1982. 我国克山病的分布和硒营养状态的关系. 营养学报, 4(3): 191～200

杨建伯, 杨秋慧. 2000. 克山病病因研究. 中国地方病学杂志, 5: 350～355

于维汉. 2004. 克山病 100 年——回顾与展望. 中国地方病学杂志, 23(5): 395～396

中国科学院地理研究所化学地理组. 1974. 克山病的流行规律(时间上的)与气候条件的关系. 中国地方病防治杂志, 3: 6～15

Beck MA, Kolbeck PC, Rohr LH, et al. 1994. Benign human enterovirus becomes virulent in selenium-deficient mice. J Med Virol, 43(2): 166～170

Sun S. 2010. Chronic exposure to cereal mycotoxin likely citreoviridin may be a trigger for Keshan disease mainly through oxidative stress mechanism. Medical Hypotheses, 74: 841～842

Yu WH. 1999. A retrospect on the studies of Keshan disease in China. Chinese J Epidemiol, 20(1): 11～14

撰稿人：孙树秋
哈尔滨医科大学、中国疾病预防控制中心地方病控制中心

大骨节病病因不解之谜

A Vague Question of Kaschin-Beck Disease's Cause

大骨节病是一种原因未明的地方性、多发性、变形性骨关节病。本病主要流行于我国川藏至黑龙江的狭长地带，累及 14 个省（市、区）的 366 个县（旗），向东北延伸到俄罗斯乌洛夫流域的赤塔州、阿木尔州和朝鲜咸镜南、北道等北部山区，世界其他地方没有本病流行。

大骨节病最初（1849 年）由俄国界标师 Yurensky 在乌洛夫河流域发现形似侏儒患者；其后，军医 Kaschin（1854 年）和 Back（1901 年）先后对该病进行了调查，确认其为一种独立的疾病，由此，1906 年国际上将其命名为 Kaschin-Beck disease（KBD）。我国对这种病症描述的文字记载可追溯到明朝末年《山西安泽县志》（1644 年）和清朝末年《长白山江岗志略》（1908 年）。1934 年张凤书医师报道沈吉、长图铁路沿线有该疾病流行是国内最早的医学文献报告。我国医学工作者根据患者关节增粗变形的临床特征将该病命名为“大骨节病”。

大骨节病主要发生在 7～12 岁的发育期儿童，原发病变为骺软骨、骺板软骨、关节软骨深层细胞的变性、坏死，伴随软骨内化骨障碍，邻近部位骨组织相继出现破坏、增生、改建、变形，最终形成典型的骨性关节炎（osteoarthritis，OA）。病变轻者指（趾）关节增粗、变形；重者身材矮小、畸形，甚至丧失劳动和生活自理能力（图 1～图 3）。由于目前国际上对骨关节炎的治疗尚无特异药物和方法，因此探明病因是防治大骨节病的关键。

由于大骨节病主要流行于我国，因而国外相关文献报道极少。多年来，我国科学工作者根据本病的地域发病特征和关节软骨损伤特点，围绕地理环境致病因素，从进入人体的水、土、粮传播途径做了大量的调查研究，曾提出多种单一或复合的可疑致病因素，但随着研究工作的深入，一些可疑因素相继被淘汰。目前形成的病因学说有：①生物地球化学说；②粮食真菌毒素中毒说；③饮水有机物中毒说。

1. 生物地球化学说

该学说认为，本病发生与病区环境中某些化学元素或化合物过多、缺乏、比例失调等因素有关。自 1939 年苏联学者 Vinogradov 提出该假设，经对病区众多元素测定，以及与病情相关性分析，除硒元素缺乏外，其他元素与大骨节病发生相关一致性不强。







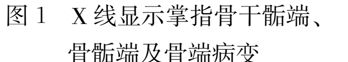


图 1　X 线显示掌指骨干骺端、骨骺端及骨端病变　　图 2　临床Ⅱ度患者　　图 3　临床Ⅲ度患者

20 世纪 70 年代，我国医学和地学工作者联合调查发现病区多处于低硒地带。由此，围绕环境硒缺乏与大骨节病关系展开了大量的调查研究工作，确认低硒饮食与本病发生、发展密切相关。主要依据有：①病区普遍处于低硒生态环境；②饮食低硒导致该人群硒营养状态低下，机体呈氧化应激状态；③补硒能降低发病率，并促进病变早期干骺端损伤的修复。但也有证据显示，低硒并非大骨节病发病的始动因子，依据有：①病区并非均处于低硒地区，且部分低硒地区并不发病；②病区内病户与非病户人体内硒水平无差异；③易感人群补硒不能完全控制新发病例；④软骨细胞生长对硒并无特殊需求，低硒饮食未能复制类似软骨病变特征的动物模型。鉴于此，多数学者认为，硒缺乏是本病发生发展过程中的一个重要环境危险因素。

2. 粮食真菌毒素中毒说

该学说认为，谷物在收割、脱粒、晾晒等环节受镰刀菌污染，受病区特定气候环境影响，污染菌进一步孳生并合成耐热的真菌毒素，食用这种超量聚集毒素的粮食可引发大骨节病。主要依据有：①病区大陆性气候适宜真菌生长和产毒；②病区产粮中检出镰刀菌为优势菌种，并含超量镰刀菌毒素（T-2 毒素）；③病区产小麦、玉米等粉粮是致病因子的主要载体，换食非病区粮可有效控制新发病

例；④用病区粮、病区粮分离所获的镰刀菌毒素或 T-2 毒素纯品制成的饲料均可引起实验动物出现类似早期关节软骨特征性病理改变。然而该学说仍有一些未解之谜：①用适宜真菌孳生、产毒的特定病区气候环境条件难以解释病区近距离灶状分布这一流行特征；②各病区分离出的优势菌株和毒素不尽相同，关节软骨也并非是其特异作用靶点；③镰刀菌毒素（T-2 毒素）致深层软骨细胞损伤机制尚不十分清楚。

3. 饮水中有机物中毒说

该学说认为，病区饮水被残腐植物污染，其中阿魏酸、对羟基桂皮酸、黄腐酸等有机物致机体慢性中毒是本病病因。主要依据有：①病区饮用水水源与病情有一定的关系，改水可部分降低新发病例；②病区饮水中腐殖酸含量与病变检出率相关；③腐殖酸及其衍生物可致软骨细胞代谢偏移、活力降低、变性等类似的病理性改变。然而该学说也有难解之疑：①病区与非病区饮水中腐殖酸含量无显著性差异；②饮用同一水源的家庭发病可截然不同；③腐殖酸等提取物未能复制出类似的动物模型。由于该学说所依据的现场调查和实验结果未获相同结果，因而争议众多。

此外，依据本病家庭高发的特点，有学者探讨了家庭聚集性和同胞间遗传度。结果显示，本病具有明显的家庭聚集性，同胞间遗传度为 28.61%；用荧光标记基因扫描方法，分析了 2、11 和 12 号染色体上 64 个短串联重复序列（STR）位点多态性，其中 6 个 STR 频率在患者与病区及非病区人群间存在显著差异；通过基因芯片和蛋白质组学芯片技术，发现患者软骨细胞中有 79 个基因与正常对照间呈现 2 倍以上差异、16 个血清差异表达蛋白质。研究提示，在大骨节病发生发展过程中，软骨发育、损伤和调节等与基因多态性及蛋白质异常表达存在一定的关系。

综上所述，尽管大骨节病病因至今仍未完全明了，但依据上述病因学说所采取的综合预防措施已基本控制了本病的区域性流行。目前，针对上述危害因素的致病特点，围绕大骨节病损伤靶点开展的“自由基”损伤机制、细胞因子和基因调控途径等研究尚在探索中。随着生物医学技术的发展，利用现代分子生物学技术和分子流行病学方法，在高危病区内，通过前瞻性病例对照研究，探讨各危险因素的交互作用。从特定病区地理环境、易感人群暴露剂量、效应及个体易感基因表达差异等多领域的研究，将有助于进一步揭示大骨节病发生、发展的本质。

参考文献

郭雄，张宝弟，张永忠．2009．大骨节病病因的评价．中国地方病学杂志，(4)：470～473
郭雄．2008．大骨节病病因发病机制与防治研究的进展与展望．中国地方病学杂志
林年丰．1982．大骨节病水土病因研究今昔．中国地方病防治杂志，(3)：37～46

莫东旭,丁德修,王治伦,等. 1997. 硒与大骨节病关系研究 20 年. 中国地方病防治杂志,12(1):18~21
史晓薇,郭雄,任峰玲,等. 2008. 大骨节病家庭聚集性和同胞对遗传度分析. 南方医科大学学报,(7):1187~1189
杨建伯. 1998. 大骨节病病因研究. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社
中华人民共和国地方病与环境图集编撰委员会. 1989. 中华人民共和国地方病与环境图集. 北京:科学出版社,39
朱育惠. 1985. 中国医学百科全书地方病学. 上海:上海科学技术出版社,16~19

撰稿人:周令望
哈尔滨医科大学、中国疾病预防控制中心地方病控制中心

溯本求源，彻底揭开地方性氟中毒的面纱

The Study on Pathogenic Mechanism of Endemic Fluorosis

地方性氟中毒（endemic fluorosis）简称地氟病，是在自然条件下，人们通过饮水、空气或食物等介质，摄入过量的致病因子——氟而导致的全身慢性蓄积性中毒。临床上最主要表现为牙齿和骨骼的改变。牙齿损伤的表现称为氟斑牙（dental fluorosis），其牙釉质可出现白垩、着色或缺损改变，残留终生，轻则影响美观，重则影响咀嚼及消化功能，危害健康。骨骼损伤的主要临床表现称氟骨症（skeletal fluorosis），腰腿及全身关节可出现麻木、疼痛等，甚至弯腰驼背，发生功能障碍，终至瘫痪。除了牙齿和骨组织的症状明显之外，氟中毒患者还表现有其他器官和系统的非特异性损伤。

地方性氟中毒在世界上很多国家和地区都有流行，在我国的病区分布更为广泛，除上海市和海南省外，其他省（市、区）均有地方性氟中毒的流行。另外，我国病区类型复杂，不仅有饮水型（the type of drinking water）病区，还有我国特有的燃煤污染型（the type of burning coal pollution）和饮茶型（the type of drinking tea）病区。我国饮水型氟中毒病区县有 1135 个，病区村有 127 095 个，病区村人口有 8739.34 万，氟斑牙人数有 2360 万，氟骨症患者有 140 万；燃煤污染型氟中毒病区县有 178 个，有病区村有 41 086 个，病区村人口有 3446.38 万，氟斑牙人数有 1616 万，氟骨症患者有 184 万；饮茶型氟中毒病区主要分布在西藏、四川、内蒙古、新疆、青海、甘肃和宁夏等省（区），病区人口有 3100 多万，现有中度以上氟骨症患者 300 余万，氟斑牙儿童 50 多万。

地方性氟中毒的病因非常明确，但发病机制至今仍未完全清楚，尤其是我国氟中毒类型复杂，各种类型的氟中毒病情各有特点，为发病机制的研究带来一定的影响。目前，氟中毒发病机制研究工作主要针对以下几个方面：一是对氟骨症发生机制的研究；二是对氟斑牙发生机制的研究；三是对非骨相组织损伤机制的研究。因为氟中毒导致非骨相组织损伤的特征是非特异性的，除了在神经系统损伤机制方面有一些深入细致的研究之外，对其他非骨相组织的损伤机制研究大多还停留在氟诱发的氧化应激损伤阶段。氟骨症和氟斑牙发生机制的研究比较深入和系统。由于氟骨症对健康的影响直接且严重，所以氟骨症发病机制一直是各领域的研究热点。氟骨症发生机制研究一般都是从氟中毒患者骨骼系统的病变特点出发，主要集中在以下几个方向：一是研究氟对成骨过程

的影响，主要观察氟对成骨细胞功能的影响以及影响成骨细胞活性的一些激素、细胞因子的作用；二是研究氟对破骨活性的影响，主要研究氟对破骨细胞的数量、功能及调节因素的影响；三是研究氟对骨及软骨细胞基质成分的影响。氟对牙齿损伤机制的研究早期主要集中在氟抑制牙齿造釉细胞分泌牙釉质，导致釉柱晶体形成紊乱，从而形成牙釉质折光性、强度及耐腐蚀性下降形成氟斑牙。近期部分学者将注意力集中在氟致造釉细胞内质网应激，继而导致造釉细胞合成分泌功能减退、凋亡增加，分泌的釉基质减少，形成氟斑牙。根据上述研究成果，目前氟中毒发病机制研究领域主要形成了氧自由基损伤学说、胶原代谢学说及“钙矛盾疾病”学说。三种学说均能部分解释氟中毒的某些病变特征，但均不能清晰地阐述氟中毒发生的过程。尤其是针对我国不同类型的氟中毒所特有的病变损伤特征，任何一个学说均不能做出很好的解释，这也是氟中毒发病机制成为重大科学难题的原因。

氟中毒作为病因非常明确的疾病之一，除了具有丰富的病区现场资源之外，还可以非常容易地复制出具有典型病理损伤的动物模型，并且还可以方便地获得体外的细胞模型资源，应该说具备了解决发病机制这一科学难题的客观条件。笔者认为，解决氟中毒发病机制首先要制备典型的细胞模型或动物模型，通过典型的模型找出氟化物作用于靶细胞或器官的特点，找到影响靶细胞或器官发生效应作用的关键靶点；再结合不同类型氟中毒的病理生理学特点，阐明在不同条件下氟进入体内后的生物学作用过程，寻找不同类型氟中毒发生过程中的固有特征；最后，还要根据不同类型氟中毒的特点找到影响氟中毒发生的关键控制环节进行干预，从而进一步确认氟中毒发生机制中的关键环节，最终清晰地勾勒出氟进入体内之后发挥的病理生理作用，阐明氟中毒发病机制。显然，上述内容仅靠个别团队或单个学科的工作是无法完成的，必须开拓思维、加强合作、重视学科交叉、整合多个领域的资源优势开展攻关。我们有信心，在不久的将来，地方性氟中毒必将成为一种病因明确、防治措施清楚，同时发病机制也非常明确的地方病而被有效地控制。

参考文献

李广生，张文岚，华坤，等．2003．地氟病属于“钙矛盾疾病”．矿物岩石地球化学通报，22(2)：93～95

任立群，李广生，孙波．1998．中长周期慢性氟中毒对大鼠骨转换的影响及机理研究．中国地方病学杂志，17(2)：75～78

孙殿军，高彦辉．2008．从骨转换角度探讨氟骨症发生的分子机制．中国地方病学杂志，27(3)：239～241

孙殿军．2009．论中国地方病之控制前景．中国地方病学杂志，28(1)：3～6

孙玉富．2003．自由基与氧化应激及其在地方性氟中毒发病中的作用．中国地方病防治杂志，18(1)：37～40

徐鹏,郭雄.1998.氟中毒对胶原代谢影响的研究现状.国外医学·医学地理学分册,19(4):152～156
徐鹏,郭雄.2001.氟中毒对软骨的损伤及机理.地方病通报,16(3):83～84

撰稿人:孙殿军
哈尔滨医科大学、中国疾病预防控制中心地方病控制中心

解决地方性砷中毒发病机制——一项刻不容缓的艰巨任务

The Study on Pathogenic Mechanism of Endemic Arsenicosis

地方性砷中毒（endemic arsenicosis）简称地砷病，是一种生物地球化学性疾病；是居住在特定地理环境条件下的居民，长期通过饮水、空气或食物摄入过量的无机砷而引起的以皮肤色素脱失和（或）过度沉着、掌跖角化及癌变为主的全身性的慢性中毒。无机砷除了可以导致皮肤改变外，还是国际癌症研究中心（IARC）确认的人类致癌物，可致皮肤癌、肺癌，并伴有其他内脏癌高发。在重病区，当切断砷源后或离开病区，经过多年仍有地砷病的发生，表明由砷引起的毒害可持续存在很长时间，并逐渐显示出远期危害——皮肤改变、恶性肿瘤及其他疾病等。目前已发现，许多国家有地砷病的流行，如美国、加拿大、墨西哥、阿根廷、智利、印度、孟加拉、泰国、罗马尼亚、匈牙利等。全世界饮用含砷超过 0.05mg/L 饮水人口大约 5000 万以上，其中印度的西孟加拉邦和孟加拉国是世界上最大的砷中毒病区，仅孟加拉国就有 3000 万人受威胁。我国新疆、内蒙古、山西、贵州、宁夏、吉林、青海、安徽、陕西、湖北、甘肃等省（区）发现地砷病的流行，共有病区村 553 个，病区村人口 45 万，已诊断患者 12 482 人。燃煤污染型地砷病是我国特有的一种类型，全世界病区仅分布在我国贵州、陕西两省，有病区村人口 31.01 万，已诊断患者 16 463 人。

由于人类对地方性砷中毒的认识较晚，对其发病机制的研究还不是很充分。目前，砷中毒的发病机制有多种假说提出，包括砷可致氧化应激、染色体畸变、干扰 DNA 甲基化、抑制 DNA 修复、诱导细胞增殖、改变信号转导模式等，但至今仍没有一种确定的机制学说。近年来以砷代谢为突破口的砷中毒发病机制探索成为新的研究热点。饮水中的砷主要为无机砷（iAs），其中三价无机砷（iAs^{3+}）的毒性大于五价无机砷（iAs^{5+}），部分原因在于细胞对两者的吸收速率不同。iAs^{3+} 主要通过水解糖蛋白转运体进入细胞，iAs^{5+} 通过磷酸转运体转运。研究表明，相同浓度下，iAs^{3+} 在不同细胞中蓄积的速度都高于 iAs^{5+}。iAs^{3+} 在体内外试验中都被证实可产生大量的活性氧和自由基，并引起氧化应激所致的血红素加氧酶的产生增多。流行病学调查显示，高砷暴露人群血中活性氧水平显著升高，抗氧化物质水平显著下降，同时血砷浓度与升高的活性氧和下降的抗氧化物之间呈显著相关性。砷通过诱导氧化应激间接产生对 DNA 的损伤。还有一些

研究表明，砷可以改变染色体的完整性，诱导细胞染色体畸变和核内复制。砷进入机体后的甲基化代谢已在多种哺乳动物和人群中得到证实，但关于甲基化具体过程还存在争论。无机砷在体内代谢能产生不同形态和价态的砷化物，这些砷化物具有不同的毒性和靶器官。尿砷含量及形态分布是评价人群近期砷暴露和机体砷代谢的重要指标，但个体间存在很大差异。砷有明显的亲硫特性，人体内巯基（—SH）是酶类催化过程中重要的功能团，而砷和巯基的结合，抑制了一些酶的活性，使机体内的正常生物化学反应、生理过程受到障碍，长期的异常反应就必然引起体内各系统发生一系列的功能性或病理性改变。在皮肤组织中，砷与角蛋白的巯基结合而蓄积，蓄积的砷初期刺激了铬氨酸酶，使黑色素细胞产生了大量色素，沉积在皮肤中，随着砷的蓄积使黑色素细胞受到抑制，甚至凋亡，导致皮肤出现退色性斑点及脱色性斑点。皮肤中的砷直接作用于小血管和毛细血管，使皮肤毛细血管充血及循环紊乱。掌跖部位是人体表皮组织厚度最大的部位，又缺乏毛囊组织，所以在掌跖部皮肤蓄积的砷极难排出。在砷的刺激下，掌跖部皮肤基底细胞乃至棘细胞均出现活跃增生，但表皮的角质层因与砷结合而影响了其成熟，形成发育不全改变，难以脱落，最终导致明显的增厚角化。

尽管各国学者们在上述领域已经开展了一些非常有意义的工作，为砷中毒发病机制研究奠定了一定的基础，但距离真正揭示其复杂的发病过程无疑还有很长的路要走，还需要在理论和技术等方面有所突破。目前，解决该问题的最大难点在于没有适合的动物模型可以应用于砷中毒的发病机制研究。以砷中毒患者为研究对象无疑是最直接、最可靠的样本，但限于组织取材及伦理学的限制很难有太大的突破；体外系统对砷的定性和定量反应受多种因素的影响，且脱离了机体复杂的调控系统，所得出的一些结论很难推及到体内。建立与人类砷中毒类似病理损伤的动物模型已经成为研究砷中毒发病机制的瓶颈问题。动物模型是研究发病机制的最佳手段，但因为动物与人类在砷代谢及耐受性等方面存在着巨大的差异，目前还没有复制模型成功的案例。

解决上述问题，关键在于砷中毒理论的创新及实验技术的创新，从砷进入机体的那一时段开始，从代谢、损伤、修复等多种角度去探索可能的理论基础；充分利用现代蛋白质组学技术、代谢组学技术、转基因技术，观察砷对机体的损伤过程；在综合使用现代方法、整合多学科队伍的工作基础上对砷中毒发病机制开展研究工作。

参考文献

孙殿军．2008．中国地方病病情、防治与对策．中华预防医学杂志，42(9)：1～3
孙贵范．2009．我国地方性砷中毒研究进展．环境与健康杂志，26(12)：1035～1036
IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans．2004．Some drinking-

water disinfectants and contaminants, including arsenic. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 84: 1～477

Ratnaike RN. 2003. Acute and chronic arsenic toxicity. Postgrad Med J, 79: 391～396

Sakurai T, Himeno S. 2006. Endocrine disruptive effects of inorganic arsenicals. Environ Sci, 13(2): 101～106

撰稿人：孙殿军

哈尔滨医科大学、中国疾病预防控制中心地方病控制中心

结核分枝杆菌中存在哪些影响宿主免疫保护性抗原相关的基因

Are There Any Host Immune-Protective Related Genes Existing in Mycobacterium

当前全球约有1/3的人已感染了结核分枝杆菌。在通常情况下，在与结核病患者接触的人中，有一半人会被感染，在结核分枝杆菌感染者中有5%～10%的人会发病。结核病可以在人体和人群中播散，其原因之一就是结核分枝杆菌可以在专职吞噬细胞中生存并可处于静息状态持续很长时间，若其恢复增长则可以使结核病复发。

结核病的病原体和其宿主间的关系无疑是复杂的，结核分枝杆菌感染人体后许多基因表达发生了改变，研究显示这些基因可以分成不同种类的家族。然而，目前对于宿主的免疫应答过程及结果，仍然有许多关键环节不甚清晰，比如哪些基因对宿主的防卫是不可缺少的？哪些促进了微生物的侵入、存活和发病？结核分枝杆菌（和它们的产物）被认为是与宿主的不同细胞受体作用，刺激了共同的和特异性的信号途径，并激活了一些不同的基因的表达。结核分枝杆菌可以在人体长期潜伏感染，可能与诸如prcBA等编码蛋白酶体复合物的基因沉默有关，但其具体的机制和其他基因的作用仍然需要进一步阐明。结核杆菌入侵体内后，能够抵抗巨噬细胞中溶酶体的酸化作用，使得结核分枝杆菌可以从巨噬细胞中逃逸并且可以感染新的宿主细胞，从而在宿主体内长期潜伏（图1～图3）。

结核分枝杆菌持留状态是导致结核病化疗疗程偏长、疗效不佳及化疗后易再次复发的主要原因之一。因而，研究结核分枝杆菌的持留态对于结核的预防和治疗都有重要作用，一方面关注持留状态与活跃状态下的结核分枝杆菌在转录和转录后水平的差异，有助于阐明结核分枝杆菌的持留态原理，并寻找持留状态的分子标志，为预防和诊断结核杆菌感染提供理论基础；另一方面关注持留状态分枝杆菌向活跃状态分枝杆菌的转变过程，可以为结核杆菌携带者向活动结核患者的转变提供检测依据和参考。蛋白质化学修饰在结核分枝杆菌中作用的研究表明，蛋白质磷酸化、甲基化、乙酰化等修饰对于蛋白质发挥功能有重要作用，通过蛋白质组学研究方法，可以初步建立不同状态下的分枝杆菌的蛋白修饰谱，结合结核分枝杆菌的表型特征，了解这种转录后的调控机制；金属离子在结核分枝杆菌生长代谢过程中发挥重要作用，铁离子和镁离子对于结核分枝杆菌的生长是必需

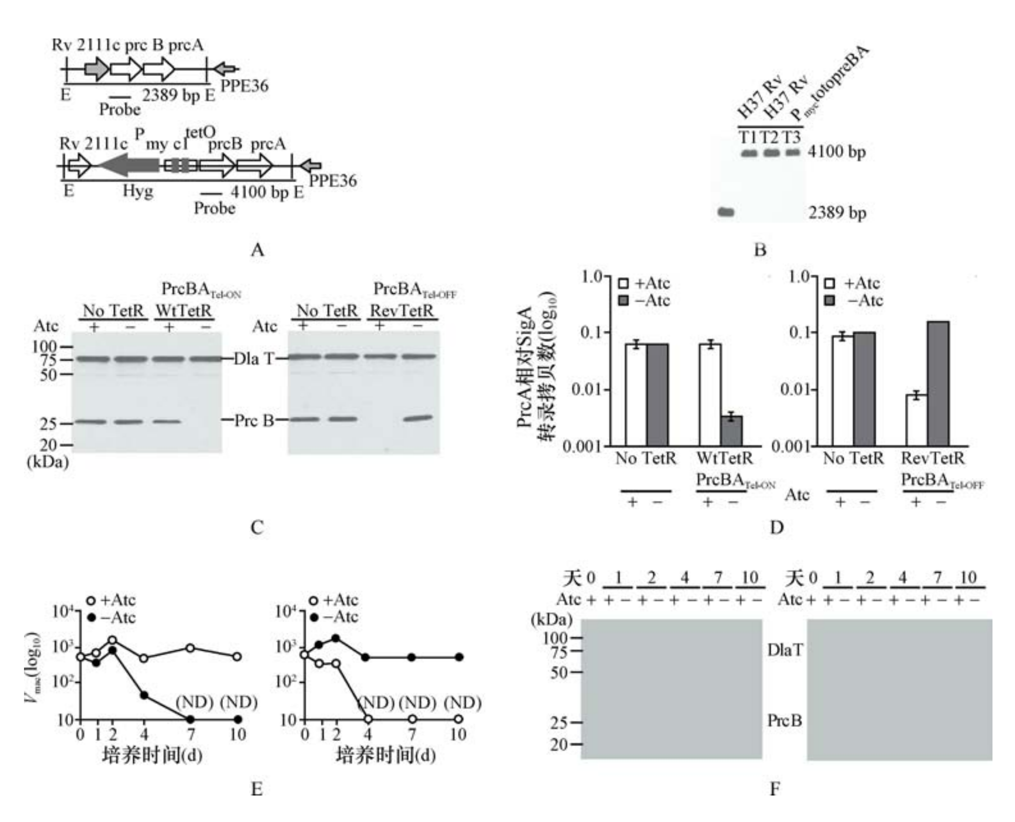


图 1　Tet-on 和 Tet-off 体系可以使编码蛋白酶体复合物的基因有效而快速地沉默

引自 Sheetal Gandotra，et al. 2007. Nature Medicine

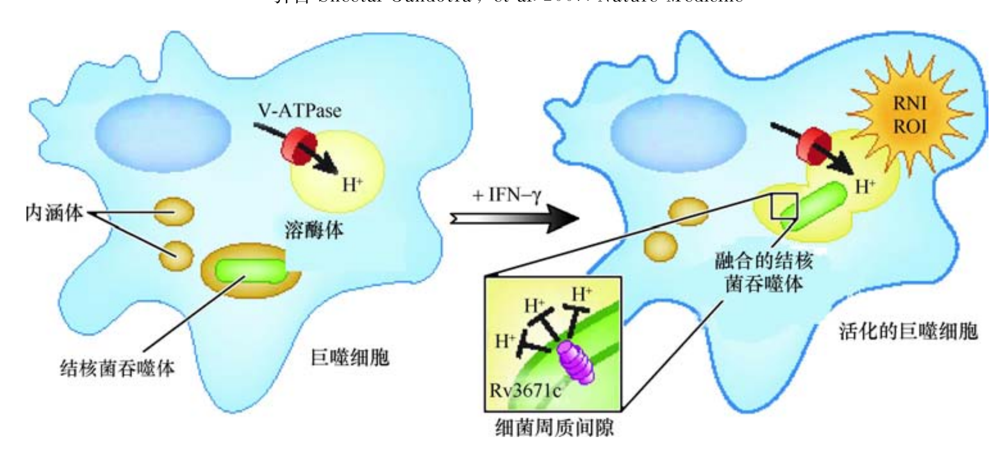


图 2　结核分枝杆菌通过修饰宿主体内吞噬细胞的吞噬体的循环网络而阻止溶酶体的溶菌作用

引自 John D MacMicking. 2008. Nature Medicine

的。因此，金属离子对结核分枝杆菌作用的确切阐明，对于新药物开发将会开辟一个新思路。

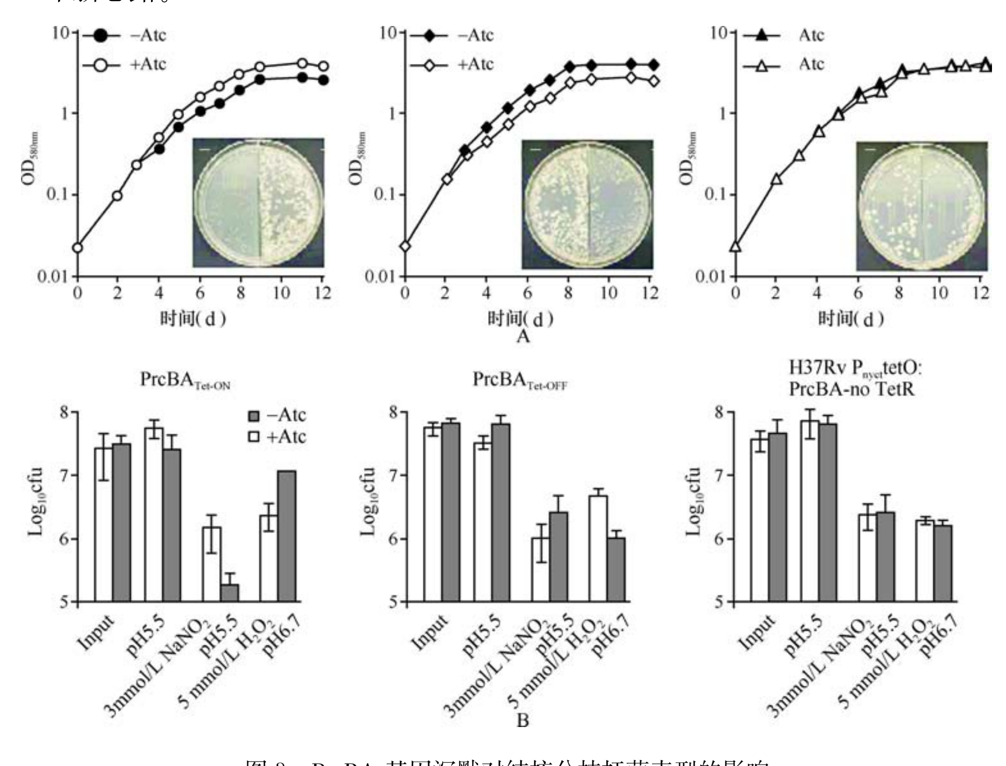


图 3　PrcBA 基因沉默对结核分枝杆菌表型的影响

A. 生长状况；B. 菌落形成。引自 Sheetal Gandotra，et al. 2007. Nature Medicine

结核分枝杆菌全基因组序列测定确定了 4000 多个基因，但当前仅明确了对与结核分枝杆菌生长、致病性及耐药性等相关的部分基因的功能，仍然有许多基因功能以及基因之间的相互关系不甚清晰。也没有找到特异性较强的抗原及有效的宿主免疫保护性抗原。新疫苗和简便、快速、敏感性和特异性高的诊断新技术的研发都将得益于结核分枝杆菌不同基因功能的研究及找出特异性较强的抗原和有效的免疫保护性抗原。新药的研发同样依赖于对结核分枝杆菌基因结构和功能的深入理解。目前对于结核病的宿主和病原体以及两者的相互作用仍有许多机制不清晰。例如，为何并非所有感染者发病，为何发病者临床归属各异，为何 BCG 在人群中的保护性各异，为何结核保护性免疫的效率各异，结核性潜伏感染的由来和本质，结核性免疫反应的特异性本质，结核性保护性免疫效率差异本质，个体行为差异的本质，等等。这些方面的相关机制的清晰阐述将会给人类与结核病的长期斗争带来革命性的变化。

分泌性蛋白是结核分枝杆菌生长过程中分泌到胞外的一类蛋白质，是目前发

现的保护性最好的一组抗原蛋白，对结核病的防治具有重要意义。此外，一些存在于细菌细胞壁及细胞质中的蛋白质，也能诱导细胞免疫反应，对结核的感染发挥免疫保护作用。其中分泌性蛋白和细胞壁表面的蛋白质是主要的免疫保护性抗原，将有望成为新疫苗研究的重要靶抗原。与大多数生物不同的是，结核分枝杆菌基因组携带有两组 GroEL 基因，即 GroEL1 和 GroEL2，它们分别编码 HSP60 和 HSP65。HSP65 具有 20 多个 T 细胞抗原决定簇，其中 1 个是结核分枝杆菌和卡介苗特异性的，该抗原具有很好的免疫保护与免疫治疗作用。结核分枝杆菌 HSP60 是一种高度保守的细胞内抗原，因此结核分枝杆菌感染会产生针对机体 HSP60 的交叉免疫反应，可引起实验动物产生自身免疫性疾病。有研究显示，HSP60 具有比 HSP65 更强的细胞因子诱导能力，能使人外周血单核细胞产生促炎症反应细胞因子 IL-1β、TNF-α、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、GM-CSF，而不能刺激产生保护性细胞因子 IFN-γ 和 IL-4。HSP60 与分枝菌酸的生物合成有关，这对 MTB 在体内尤其是在巨噬细胞内的生存有重要的意义，基因敲除实验结果也证实了这一点。

结核分枝杆菌脂质代谢组学的研究对于结核分枝杆菌有着重要作用。一方面，脂质作为结核分枝杆菌的结构成分，在分枝杆菌的生长速度、持留状态转换、逆境胁迫、耐药性方面发挥重要作用；另一方面，许多释放到外周的脂质作为信号分子的一类，这些脂类分子对于分枝杆菌的感染过程可能发挥重要作用。因此，分析结核分枝杆菌的脂类物质在各种不同状况（包括持留状态、活跃状态、不同药物处理及一些活性氧或活性氮诱导）下的脂肪酸代谢变化，特别是一些分枝杆菌特异性的脂质的变化，对于阐明结核分枝杆菌生物学及与宿主相互关系起重要作用。此外，脂质代谢组学的研究进一步指导针对新的靶位点开发新型药物。

结核分枝杆菌属于慢生长分枝杆菌，这种低速增殖使得细菌学检测受到很大的限制，即延长了患者的检测时间。非结核分枝杆菌中存在许多快生长分枝杆菌，两种类型的分枝杆菌在基因组水平上高度相似，然而繁殖速度相差较大。因此，研究两种类型的分枝杆菌的转录水平差异对于揭示生长速度的差异具有重要作用。结核杆菌的复制速度与人体的免疫状况相关，进一步应用新技术确定与宿主免疫保护性抗原相关的结核分枝杆菌的基因功能，明确结核分枝杆菌在人体长期潜伏的机制，是研究结核病的免疫机制和发病机制的新方向。

参考文献

Darwin KH，Ehrt S，Gutierrez-Ramos JC，et al. 2003. The proteasome *of Mycobacterium tuberculosis* is required for resistance to nitric oxide. Science，302：1963～1966

Demartino GN，Gillette TG. 2007. Proteasomes：machines for all reasons. Cell，129：659～662

Dye CS, Scheele P, Dolin, et al. 1999. Consensus statement global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence and mortality by country. WHO Global Surveillance Monitoring Project. JAMA, 282(7): 677～686

John D MacMicking. 2008. *M. tuberculosis* passes the litmus test. Nature Medicine, 14: 809～810

Lathem WW, Price PA, Miller VL, et al. 2007. A plasminogen-activating protease specifically controls the development of primary pneumonic plague. Science, 315: 509～513

Sheetal Gandotra, Dirk Schnappinger, Mercedes Monteleone, et al. 2007. In vivo gene silencing identifies the *Mycobacterium tuberculosis* proteasome as essential for the bacteria to persist in mice. Nature Medicine, 13: 1515～1519

Wendy P Gill1, Nada S Harik, Molly R Whiddon, et al. 2009. A replication clock for *Mycobacterium tuberculosis*. Nature Medicine, 15: 211～214

撰稿人：王黎霞　何广学　赵雁林

中国疾病预防控制中心结核病预防控制中心

血吸虫病无创伤性快速诊断技术

Non-invaded and Fast Diagnostics of Schistosomiasis

当前，血吸虫病诊断技术主要采用粪便检查和血清学免疫诊断方法。由于粪便检查方法采样较为困难，方法的技术正确性因人而异，难以标准化而影响诊断的正确性，且一次性大量标本难以及时完成。血清学免疫诊断方法，一方面必须采集人体的血液样本后才能完成诊断，具有创伤性；另一方面仅能确认人体是否既往感染血吸虫，难以确认现症病例。

日本血吸虫的成虫寄生于人及多种哺乳动物门静脉系统，产出的虫卵沉积于肝脏及肠壁组织。在肠壁组织中的虫卵分泌物刺激组织在局部形成虫卵肉芽肿，使肠壁溃破，虫卵得以随粪便排出体外，其生活史完成才具可能。由于日本血吸虫成虫寄生于血管内，成虫及虫卵的分泌排泄物，即所谓的循环抗原存在于血液循环中，而与泌尿系统及唾液分泌无直接联系。随着现代免疫学及其检测技术的迅猛发展，尤其是自 1979 年将单克隆抗体（McAb）用于血吸虫病的检测以来，使检测的敏感性和特异性大为提高，这就引起人们对尿循环抗原检测的重视。Deelder 等证明了感染曼氏血吸虫宿主的尿液中存在着循环趋阴极抗原（CCA）和循环趋阳极抗原（CAA），而以 CCA 占优势。高分子质量的 CCA 反应有聚合作用，解释了为什么此抗原在尿中比 CAA 丰富得多。CCA 和 CAA 两抗原均定位于肠上皮内衬细胞，均具热稳定性，溶于三氯醋酸，不溶于氯仿，可对抗蛋白水解酶、DNA 酶和 RNA 酶作用，但可被高碘酸破坏。按其来源可分为血吸虫肠相关抗原（GAA）、膜相关抗原（MAA）和可溶性虫卵抗原（SEA）。GAA 分为趋阳极抗原（CAA）和趋阴极抗原（CCA）。CAA 是一组分子质量近 70kDa 的蛋白多糖。Carlier 等从血清检测到的 CCA 分子质量从 50kDa 到 300kDa 不等，而从尿液中检出的则小于 30 kDa。曼氏血吸虫病患者经吡喹酮治疗后，尿液中的 CCA 在 1 周内全部转阴。因此检测患者尿液中 CCA 的滴度变化可用于疗效考核。CAA 主要化学成分为 *N*-乙酰半乳糖和 *D*-葡萄糖醛酸。曼氏血吸虫病和埃及血吸虫病患者尿中 CAA 浓度比血中 CAA 浓度低，约为 1/50。在 1 天内不同时间测定曼氏血吸虫病患者尿中 CAA 浓度，其滴度无明显变化。曼氏血吸虫病患者血中 CAA 浓度与粪便虫卵计数相关，但尿中 CAA 浓度和粪便虫卵计数不相关。患者经有效化疗后，血中 CAA 浓度显著下降，尿中 CAA 浓度的下降比血中约晚 1 周。治疗后第 6 周血中 CAA 全部转阴，而有 53% 的患

者尿中仍可检测到 CAA，但滴度已明显下降。由于尿中 CAA 排泄慢，不宜用于疗效考核。近年来，有学者发现血吸虫病患者尿液中不仅存在 CAA 和 CCA，还存在可溶性虫卵抗原。Nibbelingg 等用夹心 ELISA 检测 35 例曼氏血吸虫病患者经吡喹酮治疗后 1、3、6 周尿液中可溶性虫卵抗原（CSEA）水平，结果尿中 CSEA 明显不同于虫源性抗原 CCA。治疗后 1 周，尿中 CCA 水平锐减，而 CSEA 下降很慢。成功治疗 6 周后，在 7 例患者尿中仍可检测到 CSEA，而 CCA 已经消失，且粪便中未发现活卵。结果表明尿液中检测到的 CSEA 来源于组织中的活卵，可作为患病的标志。Kahama 等报告 146 例埃及血吸虫病患者治疗前尿中 CSEA、CCA 和 CAA 的阳性率分别为 90%、89% 和 65%；治疗后 1、2、3、5 和 12 个月随访，尿中 CSFA 与虫卵计数和试剂条指数有明显的相关性，CAA 和与 CSEA 也有明显的相关性，CSEA 水平与虫卵计数和试剂条指数的相关性比与 CAA 和 CCA 水平的相关性更好一些。研究结果表明，检测尿 CSEA 是一种诊断血吸虫感染的有价值的辅助方法。

唾液标本具有收集简便、无损伤性、易为患者接受的优点，受到越来越多的关注。唾液中的总蛋白质浓度为 0.025～1g/100ml，较血浆中低，约为 1/100。但唾液中含有多种免疫球蛋白，主要为由唾液腺局部的浆细胞产生的分泌型 IgA（sIgA），由血清经牙龈沟渗入口腔的 IgG、IgA 和少量 IgM 与 IgE。每 100 ml 唾液中 IgA、IgG 和 IgM 的含量分别为 19.4mg、1.4mg 和 0.2mg，大约为血清浓度的 1/10、1/800 和 1/400，唾液中免疫球蛋白的含量虽低于血清，但足够用来进行免疫学诊断。因此从 20 世纪初期 Michaels 就开始用检查唾液成分作为诊断疾病的辅助工具。Garcia 最早将唾液标本用于血吸虫病的诊断。Santos 检查了巴西曼氏血吸虫病疫区 197 名居民唾液与血清中的抗 SEA IgG，检测的敏感性分别为 100% 和 98.8%，特异性分别为 64.3% 和 67.8%，两者间无显著差别。国内王兆军等则证实了慢性血吸虫病患者唾液中特异性抗体的检出率与血清中特异性抗体的检出率无显著差异。

唾液用于血吸虫病诊断标本的主要困难在于唾液中循环抗体或抗原的量低，仅为血清中浓度的百分之一，还未明了其动态消长规律，以及灵敏、特异的诊断技术方法。尿中血吸虫循环抗原的消长规律还不明了，各类抗原在尿中出现的时间不同，即使同一种抗原，尿中浓度高低也随时间不同而不同。有报道重感染曼氏血吸虫的小鼠，在感染后第 1～7 周内，尿液中以 CAA 为主，而在感染第 7 周以后，CCA 成为优势抗原。而日本血吸虫感染后尿抗原的动态规律尚未阐明。感染度对尿中 CAg 高低及检出率影响很大，有报道称轻感染者尿抗原阳性检出率仅为 50%，中度感染者达 80% 左右，而高度感染则可达 100%。尿样的处理方法不同，也是影响尿循环抗原检出的原因之一，目前仍缺乏公认的、简便的处理方法。检测中所用单抗的亲和力及针对虫体表位的不同可直接影响尿中 CAg

检测的灵敏度。

因此如何寻找出敏感性与特异性均较高的抗原或抗体，对建立新的无创伤性血吸虫病诊断试剂极为重要。而其主要意义是通过采取人体唾液、尿液等样本，以达到快速确诊人体感染血吸虫，具有无创性、快速正确等特点，有利于临床诊断血吸虫病患者，并可应用于现场大量标本的流行病学调查与监测工作，可提高人群查病的依从性，是目前防治工作中亟须解决的难题。

参考文献

刘晓明，肖祥. 2002. 检测血吸虫宿主尿抗原的研究进展. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志，20(5):315～318

田海生，朱昌亮，管晓红，等. 2000. 日本血吸虫感染者尿液诊断标志物的电泳筛选及其单克隆抗体的制备和初步应用. 中国人兽共患病杂志，16(1):39～41

王兆军，娄文娴，张恩英，等. 1999. 日本血吸虫感染兔唾液中循环抗体检测的可行性研究. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志，17(4):203～204

王兆军，薛纯良，吴维铎，等. 2000. 慢性日本血吸虫病患者唾液中特异性抗体的检测. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志，18(3):152～154

周艺彪，阳桂芬. 2000. 血吸虫尿循环抗原免疫诊断研究进展. 实用预防医学，7(1):81～82

Zhou YP, Wu ZD, Yang LL, et al. 2009. Cloning, molecular characterization of a 13kDa antigen from *Schistosoma japonicum*, Sj13, a putative salivary diagnosis candidate for *Schistosomiasis japonica*. Parasitol Res, 105(5):1435～1444

撰稿人：陈家旭　周晓农

中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所

寄生虫病的传播阈值

Transmission Threshold of Parasitic Diseases

寄生虫病的传播阈值是指当寄生虫病的传播能量较低，使寄生虫的基本繁殖率低于1时，寄生虫病的传播趋于停止或被阻断。但由于不同寄生虫的生活史复杂，传播环节不一，影响传播的因素众多，因此各种寄生虫病的传播能量不尽相同，传播阈值也就难以确定。

目前国内外研究寄生虫病传播阈值的主要方法是，在利用生物数学模型对寄生虫病的传播过程进行研究的基础上，提出相关传播阈值。首先需要了解相关寄生虫的种群动态（population dynamics）的概念。种群动态指这些个体在时间和（或）空间上的数量变化。如同其他自然界中的生命现象，寄生虫种群在宿主［终末宿主和（或）中间宿主］及自然环境中的发生、发展都不是一个静态的过程，而是一个随时间、空间不断变化的动态过程。寄生虫和宿主种群之间相互影响、制约构成了寄生虫病传播的生态系统。种群动态由4个基本的生物学过程制约，即出生、死亡、迁入和迁出。这4个因素变化决定了种群中个体数量随着时间的变化（图1）。其中，用个体变化率（per capita rate）来描述每个因素的变化，如个体出生率（per capita birth rate，b）、个体死亡率（per capita death rate，d），最后由基本繁殖率来表达种群传播趋于停止或被阻断的理论值，即传播阈值。



图1　决定种群数量变化的4个生物学过程及基本关系

其中，传播能量（C）是指1个病例在1天中预期传播感染的新病例数。基本繁殖率（R）是指1个病例在其整个病程预测直接传播的新病例数。R_0 是传染病的重要指标，为易感总体中由单个感染者引发2代病例平均数。R_0 越大，疾病传染性越强。如果 $R_0 \leqslant 1$，那么传染病的传播不能维持且将最终被根除。在整个建模过程，根据寄生虫生活史特征，可首先建立定性模型。定性模型的目的在于建立一个概念性框架，确定被研究系统的各个组成部分之间的关系。在建立了

定性模型之后，下一步即是将定性模型中概念化的关系转化为数学公式，以定量地表达系统各组分之间的关系。然后，采用数字模拟方法来帮助解析模型中的微分方程，使得复杂的、不可解析的方程更为直观地表达模型的行为，以了解被研究系统的动态。

关于应用数学方法模拟传染病传播规律的研究可追溯到 1760 年，Bernoulli 在其论文中用数学模型评价天花对期望寿命的影响。20 世纪初，Kermark 和 Mckendrick 首先利用动力学方法建立了传染病的数学模型。这包括 ReedFrost 模型、SIR 模型和 SEIR 模型、灰色动态模型、Bayesian-MCMC 统计模型等。近年，杨国静等在评价气候变化对寄生虫病传播影响时，提出了气候因子决定性模型（deterministic model）和数理统计学模型（statistic model）两大类模型。决定性模型多数是根据生物学实验得出寄生虫或中间宿主的最低或最高发育阈值来预测疾病的流行范围，所以又称之为生物学模型（biological model）、生物驱动模型（biology-driven model）。而数理统计学模型则采用数理统计学方法，如 Logistic 多因素回归模型、贝叶斯空间模型等来找出主要决定因子，然后应用建立的模型进行评估。

由于数学理论不断发展和流行病学知识不断完善，流行病学数学模型由简单到综合，使人们能够对更多流行因素及其效应做定量分析，大大增强了研究的实用性。其主要作用是应用传染病动态模型，估计群众和卫生行政部门最关心的急性传染病的传播速度、传播范围和可能带来的人群健康和生命危害与经济损失，评估疫情风险，确认预警级别，为政府启动预案提供科学依据。当数学模型应用于研究寄生虫病传播阈值后，即能最大限度地模拟疾病在人群中的自然过程。根据此模型，一方面可以有效地设计控制疾病的预防控制方案，另外还可用于预测一定力度下的控制措施后疾病流行的程度。例如，通过系统地对淋巴丝虫病病源史和生物学特性进行研究，发现当原流行区的人群微丝蚴血症率低于 1% 时，不采取防治措施经一段时间后淋巴丝虫病可自行终止传播。这一阈值的发现，直接指导了我国阻断淋巴丝虫病的防治策略，使我国成为世界上率先消除淋巴丝虫病流行的国家，并为全球消灭淋巴丝虫病提供了理论依据。又如，对一种疾病采取预防接种（vaccination）来防止其传播，可以通过数学模型，模拟这一预防接种后疾病的流行变化程度，从而获得成本-效益评价。

实践证明，在部分地区寄生虫病的传播是可以阻断的。目前我国正在规划于 2015 年消除疟疾、2020 年消灭血吸虫病。但至今，一些重大的寄生虫病（如疟疾、血吸虫病、包虫病等）的传播阈值尚未完全掌握。一方面是大部分寄生虫病生活史复杂，存在着多宿主间的疾病传播，为建立有效的传播模型带来困难；另一方面是寄生虫病的传播影响因素复杂，自然因素、社会经济因素的模拟均呈非线性关系，需要建立在基于宿主密度变化情况下的多层次、多因素的随机模型才

能有效模拟；同时，模拟的有效性仍需要应用现场的数据进行验证。我国各类流行区的生态环境复杂、多变，较难寻找一个疾病传播平衡有效假设下的传播阈值，这就严重影响了消除疟疾和消灭血吸虫病的策略制定与实施力度的确定。

参考文献

刘向明.2001. 有关可逆与两级复合型催化模型的讨论. 数理医药学杂志,14:99～100

杨国静,孙乐平,洪青标,等.2009. 血吸虫病传播气候预警模型的应用与前景. 中国血吸虫病防治杂志,21(5):432～436

杨国静,杨坤,周晓农.2010. 气候变化对媒介传播性疾病传播影响的评估模型. 气候变化研究进展,6(4):259～264

余金明,袁鸿昌.2001. 估计寄生虫感染的常用流行病学指标的数学模型. 同济大学学报(医学版),22:18～23

Anderson RM, May RM. 1991. Infectious Diseases of Humans: Dynamics and Control. Oxford, New York: Oxford University Press

Anderson RM. 1978. The regulation of host population growth by parasitic species. Parasitology, 76:119～157

Haefner JW. 1996. Modeling Biological Systems: Principles and Applications. New York: Chapman & Hall

Hubbard A, Liang S. 2002. Estimating the distribution of worm burden and egg excretion of *Schistosoma japonicum* by risk group in Sichuan Province, China. Parasitology, 125:221～231

Liang S, Maszle D. 2002. A quantitative framework for a multi-group model of *Schistosoma japonicum* transmission dynamics and control in Sichuan, China. Acta Tropica, 82:263～277

Spear RC, Hubbard A. 2002. Disease transmission models for public health decision making: toward an approach for designing intervention strategies for *Schistosomiasis japonica*. Environmental Health Perspectives, 110:907～915

撰稿人：周晓农[1]　杨国静[2]

1 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所

2 江苏省寄生虫病防治研究所

包虫病的诊断方法与治疗药物

Diagnostic Approach and Drug Development of Echinococcosis

包虫病是棘球绦虫的幼虫寄生在人体所致的一种人兽共患寄生虫病。我国有囊型包虫病和泡型包虫病两种，分别由细粒棘球绦虫的幼虫（棘球蚴）和多房棘球绦虫的幼虫（泡球蚴）寄生于人体组织器官所致。泡球蚴主要寄生在人体的肝脏，但可以通过浸润扩散、血行扩散和淋巴转移等方式累及肺、脑等器官。其犹如恶性肿瘤，对组织破坏严重。因此，泡型包虫病有“寄生虫肿瘤”和“第二癌症”之称。

目前，包虫病在临床上主要通过血清学检测以及 X 线、B 超和 CT 进行诊断。但这些方法对早期感染病例的检测敏感性极低，只有当感染较长时期（一般在 3～5 年后）、且肝脏部位的包虫囊肿较大时，才能诊断是否患病。手术是该病首选的治疗方法，对寄生于人体各脏器的包虫病主要是采取内囊穿刺摘除术、内囊完整摘除术等外科手术治疗。阿苯达唑、甲苯达唑等药物对于早期体积较小的包虫病均有一定的疗效。近几年研制的阿苯达唑乳剂可在一定程度上提高疗效。但是，只有少部分患者具备手术治疗的适应证，而一般只能用药物治疗。药物治疗疗程长、疗效低，且有一定的副作用。因此，针对包虫病仍无简便、正确、早期的快速诊断方法，且治疗方面没有廉价、高效的药物，极有必要开展包虫病的早期诊断方法的研究以及治疗新型药物的研发，以降低包虫病的疾病负担与危害。

目前包虫病主要通过 B 超进行普查，流行区各基层疾病预防控制机构和医疗卫生机构没有 B 超设备或仅有低分辨率的 B 超仪，无法达到及时发现、正确诊断包虫病患者的要求。原因与棘球蚴和泡球蚴在人体内寄生时，外部由一层囊包裹的生物学特性有关。此外，虽然现阶段市场上存在着以 ELISA、渗滤法、间接血凝法为基础的血清学诊断试剂，但这些试剂的灵敏度、特异度均不理想，无法在现场防治工作中为包虫病的筛查和诊断提供稳定和科学的依据。加之，我国包虫病流行区绝大多数处于老少边穷的少数民族地区，各级防治机构工作条件极其恶劣、技术水平严重落后，能够胜任包虫病诊断、治疗并开展防治工作的专业技术人员严重不足。因此，在这种缺诊断技术人员、缺诊断仪器设备的情况下，包虫病的诊断技术成为严重阻碍包虫病防治工作的重要方面，研制敏感、特异、便捷的包虫病检测试剂和诊断方法成为包虫病防治工作的当务之急。如何采

用生物标志物、影像学和其他方法相结合的方法来提高敏感度和特异性，已成为今后包虫病诊断技术的研究方向。

目前 WHO 推荐的治疗包虫病的药物为阿苯达唑和甲苯达唑两种药物。从 WHO 组织的两次多中心临床试验及其他一些国家开展的临床观察来看，两种药物对包虫病患者均有一定疗效，但需长期服用，且两种药物存在吸收差和治愈率低的问题。WHO 推荐的两种药物用法用量为：阿苯达唑推荐剂量为 10～15mg/(kg·d)，每日两次，一剂药分两次与富含油脂的食物同服，服药 28 天后，停药 14 天，疗程至少为 3～6 个月，治愈率为 30%，有效率为 70%。我国的报道表明，连续服用阿苯达唑剂量高达 20mg/(kg·d) 共 1～5 年。甲苯达唑推荐剂量为 40～50mg/(kg·d) 每日两次，一剂药分三次与富含油脂的食物同服。由于两种药物的吸收均差，药物难以渗入包囊，治愈率均较低。Eckertjet 等报道，用阿苯达唑和甲苯达唑各治疗 505 例和 366 例囊型包虫病，两者治愈率均为 30%。

我国通常采用的方法是服用阿苯达唑片剂 6 个月至 2 年。对于一些不能手术治疗的患者甚至需要终身服药。由于阿苯达唑吸收率低，故人们一直在进行改进阿苯达唑吸收的新剂型的研究，如阿苯达唑脂质体和阿苯达唑乳剂等。前者疗效虽有提高，但造价太高，难以推广普遍使用。而阿苯达唑乳剂造价相对较低，有研究表明其治疗效果较好。对 212 例肝囊型包虫病患者的临床疗效表明，用阿苯达唑 10 mg/(kg·d) 和 12.5mg/(kg·d) 两种剂量进行治疗，服药 3 个月复查 1 次为 1 个疗程，各疗程之间不间断地连续用药。两个剂量组共 212 例患者的平均近期疗效：治愈率为 74.5%，有效率为 99.1%；平均远期疗效：治愈率为 83.1%，有效率为 89.3%，复发率为 10.2%。由于疗程较长，治疗费用依然较高，以 6 个月为一个疗程算，其费用为 2500 元左右，贫困地区的患者难以承担。此外，无论采用哪一种剂型，服药时间均在 6 个月至数年，难以坚持。因此，探索一种疗效较好，服药依从性好，特别是便于长期服用的、价格相对较低的剂型，符合包虫病防治的客观需求。而发现新一代治疗药物的难度在于如何将药物直接与棘球蚴泡球蚴接触，达到直接杀死寄生虫之目的。

参考文献

柴君杰，孟贺巴特，焦伟，等. 2001. 阿苯达唑乳剂治疗肝囊型包虫病 212 例临床疗效观察. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志，(03)：129～134

张岐蜀，姜国华，胡小元，等. 2007. 棘球蚴病免疫诊断技术研究进展. 中国兽药杂志，41(6)：26～28

朱马拜，阿尔新，叶尔江，等. 2005. 包虫病快速诊断试剂盒与影像学诊断对比研究. 腹部外科，18(5)：304～305

朱勇，柳建发. 2007. 棘球蚴病免疫诊断研究进展. 地方病通报，22(5)：116～117

Davis A，Pawlowski S，Dixon H. 1986. Multicentre clinical trials of benzimidazolecarbamates in human echinococcosis. Bulletin of World Health Organization，64(3)：383～388

Davis A, Pawlowski S, Dixon H. 1989. Multicentre clinical trials of benzimidazolecarbamates in human cystic echinococcosis (phase 2). Bulletin of World Health Organization, 67(5): 503～508

Eckert J, Pawlowski Z, Dar FK, et al. 1995. Medical aspects of echinococcosis. Parasitology Today, 11(8): 273～276

WHO Informal Working Group on Echinococcosis. 1996. Guidelines for treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. Bulletin of World Health Organization, 74(3): 231～242

撰稿人：付　青　周晓农
中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所

“三江并流”区域鼠疫自然疫源地及其演化

The Natural Foci and Its Evolution of Plague in “Three Parallel Rivers” Area，China

我国目前已发现有12类鼠疫自然疫源地，分布于19个省（区）的295个县（市、旗），面积约145万 km^2，其中80%疫源地分布在西部和北部经济落后地区。20世纪80年代以来，我国西部和云南鼠疫疫情比较活跃，特别是青藏高原喜马拉雅旱獭鼠疫疫源地、滇西纵谷（剑川）齐氏姬鼠-大绒鼠鼠疫疫源地、滇粤闽居民区黄胸鼠鼠疫源地和滇西北玉龙鼠疫疫源地。

青藏高原喜马拉雅旱獭鼠疫自然疫源地于1954年被证实，主要分布在横断山脉北段，海拔3000～5000m，疫源地东与青海玉树、甘肃甘南等地相连，南与四川甘孜及云南迪庆、怒江毗邻，疫区昌都紧邻云南，均属喜马拉雅旱獭分布区。1997年在甘孜的石渠曾分离到鼠疫菌，1999年在石渠曾发生5例肺鼠疫。滇西纵谷（剑川）齐氏姬鼠-大绒鼠鼠疫疫源地（剑川野鼠鼠疫疫源地），于1974年首次被发现，疫区主要分布在剑川县山区及毗邻洱源、云龙、兰坪、玉龙4个县的部分山区，海拔2100～3000m的云南松林山区耕地景观地带，总面积约1600km^2，是国内面积最小并以非冬眠的小型啮齿动物为主要宿主的野鼠鼠疫自然疫源地。该片疫源地至今尚未波及人间。滇西北玉龙鼠疫疫源地于2005年12月首次被发现，通过系统的鼠疫流行病学调查表明，流行区域主要分布在横断山脉中断，北界于五台山南至九顶山，东至漾弓江，西至汝南河之间，海拔在2800～3500m的区域，面积约210km^2，近年动物间鼠疫流行一直处于活跃状态。滇粤闽居民区黄胸鼠鼠疫源地（家鼠鼠疫部分），近年主要流行于横断山以南，滇西、西南和南部地区以及贵州和广西局部地区，流行区海拔400～2100m。迄今已在云南的德宏、保山、大理、临沧、思茅、版纳、玉溪、红河、文山、曲靖和昆明11个州（市）共46个县（市）和贵州的兴义、广西的隆林发现有动物鼠疫流行。仅云南省累计发现疫点1271个，疫区面积约16 100km^2，其中29县（市）波及人间，累计发生腺鼠疫患者507例，死亡2例。目前，该区域鼠疫流行已得到有效控制。

剑川野鼠鼠疫与云南家鼠鼠疫在分布上不仅有区域的相对隔离，还有海拔地带的差别，但从以往的研究发现，两型鼠疫又有密切的关系。无论从鼠疫菌的蛋白质分析、质粒DNA多态性分析，以及鼠疫菌其他生态学指标模糊聚类分析，

均表明两型疫源地菌株遗传近缘。模拟现场从实验室也证实野鼠鼠疫菌株能在家鼠中造成长时间的流行；相反，家鼠鼠疫菌株很难在野鼠中造成流行。由此提出了云南家鼠鼠疫可能渊源于野鼠鼠疫。

玉龙县曾于 1984 年在石鼓镇、兰香乡从三只猎犬检测到鼠疫特异抗体；1985 年在石鼓镇桃花村从一只大绒鼠检出鼠疫 F1 抗原阳性；2001 年再次从一只大绒鼠和齐氏姬鼠扩增到鼠疫菌特异性 pla 基因。近年发现的滇西北玉龙鼠疫疫源地与石鼓相距几十千米，与剑川鼠疫疫区相距不过 100km。从鼠疫流行病学特征初步分析，疫源地景观相似、宿主和媒介一致，应属同一类型的鼠疫疫源地。

“三江并流”区域地处东亚、南亚和青藏高原三大地理区域的交汇处，由怒江、澜沧江、金沙江及其流域内的山脉组成，是世界上罕见的高山地貌及其演化的代表地区，也是世界上生物物种最丰富的地区之一，2006 年已列为世界自然遗产。“三江并流”区域是连接青藏高原和滇西山地乃至云贵高原的桥梁。

青藏高原鼠疫自然疫源地，是学术界公认的最为古老的鼠疫自然疫源地。云南和缅甸边境一带家鼠鼠疫曾经引发世界第三次鼠疫大流行。过去一直认为青藏高原鼠疫自然疫源地与滇西纵谷齐氏姬鼠-大绒鼠鼠疫疫源地以“三江”为屏障独立存在。然而，滇西北玉龙鼠疫疫源地的发现，促使我们要问它从何而来？它与目前已证实的青藏高原喜马拉雅旱獭鼠疫疫源地、滇西纵谷（剑川）齐氏姬鼠-大绒鼠鼠疫疫源地、滇粤闽居民区黄胸鼠鼠疫源地有无关联？青藏高原喜马拉雅旱獭鼠疫自然疫源地与玉龙鼠疫疫源地远隔千山万水，前者其主要宿主是喜马拉雅旱獭，同时也发现林姬鼠、绒鼠、小家鼠、褐家鼠、社鼠等染带鼠疫菌，后者主要宿主可能是绒鼠和姬鼠。如果两型疫源地有关联，那么“三江并流”区域还应该存在着过渡的旱獭型或其他类型的鼠疫疫源地。究明这些科学问题，不仅能证实滇西北玉龙鼠疫渊源在何处，分析“三江并流”区域是否是鼠疫由青藏高原向横断山谷地乃至云贵高原传播的“走廊”，同时将为解读我国鼠疫遗传与演化提供又一科学路径，具有重大的科学意义和理论价值。

目前我们的研究发现，分离自滇西北玉龙鼠疫疫源地的鼠疫菌，其生物学特征与云南剑川野鼠鼠疫菌株（不酵解麦芽糖、脱氮阳性）和家鼠鼠疫菌株（不酵解甘油、脱氮阳性）有区别，而与青藏高原喜马拉雅旱獭鼠疫自然疫源地分离的菌株很相似，能酵解甘油、麦芽糖、阿胶糖，不酵解鼠李糖、密二糖，脱氮阴性。目前正在进行的基因组学比较分析，也发现玉龙菌株与云南家鼠型和野鼠型疫源地分离的菌株存在明显差异，而与青藏旱獭型鼠疫菌基本一致。

随着我国西部大开发战略的逐步实施，西部将成为吸引投资、能源开发、旅游观光等热点地区。因此，开展“三江并流”区域鼠疫疫源地调查研究，探明是否存在鼠疫自然疫源地，以及其分布范围和流行规律，评价对人类危害，制定科

学的防控措施，为大开发战略保驾护航，已迫在眉睫。而通过旱獭、姬鼠、绒鼠、黄胸鼠甚至其他动物的实验室模型证实鼠疫能否沿“三江”河谷从青藏高原向横断山谷地及云贵高原传播，制定适合该区域的鼠疫防控措施是本研究的难点。

参考文献

董兴齐，彭何碧，叶枫，等. 1994. 云南省鼠疫疫源地鼠疫菌质粒DNA种类及分子流行病学研究. 地方病通报，9(4)：58～63

方喜业. 1990. 中国鼠疫自然疫源地. 北京：人民卫生出版社，238～257

郭英，韦蝶心，梁云，等. 2009. 云南省不同型鼠疫自然疫源地鼠疫菌生化特性比较. 中国地方病学杂志，28(4)：373～375

贺雄，王虎. 2010. 现代鼠疫概论. 北京：科学出版社，11～13

李俊勇，董兴齐，赵文红，等. 2008. 1986～2006年云南省家鼠鼠疫疫源地人间鼠疫流行病学分析. 中国地方病学杂志，27(2)：210～212

宋志忠，夏连续，梁云，等. 2008. 云南玉龙及古城区鼠疫自然疫源地判定及初步研究. 中国地方病防治杂志，23(1)：3～7

田杰. 1990. 中国鼠疫菌17种生态型的近缘分析. 地方病通报，5(4)：5～10

薛梅，汪立茂，李富忠，等. 2001. 四川省鼠疫防治现状及对策. 中国地方病防治杂志，16(1)：46～47

Lei，CX，Dong，XQ. 1997. Study on the plague natural foci in Yunnan province. 地方病通报，12(2)：37～49

Shen X，Wang Q，Xia L，et al. 2010. Complete genome sequences of Yersinia pestis from natural foci in China. J Bacteriol，192(13)：3551～3552

撰稿人：董兴齐
云南省地方病防治所

云南不明原因猝死的病因学

Causation of Yunnan Sudden Unexplained Death

云南不明原因猝死是30多年来发生在云南省西北地区部分山区和半山区的、以猝死为主要表现的、原因不明的地方性疾病。曾用名有："云南暴发性病毒性心肌炎"、"云南地方性猝死"、"云南不明原因心源性猝死"。截至2009年底，本病在云南省9个州（市）25个县（市、区）有报告，累计报告病例为414例。本病来势凶险，死亡突然，病因不清，给当地群众带来极大恐慌，影响社会稳定和经济发展，是云南省最为严重的公共卫生问题之一，受到国内外学术界的广泛关注。

既往有多家单位进行过研究，有以下几方面的发现：

第一，病例分类。云南不明原因猝死报告病例包括多种疾病实体，可以概括地分为家庭成员或有共同生活史人群的家庭聚集性猝死（57%）、不同家庭无共同生活史人群的村庄聚集性猝死（20%）和散发猝死（23%）3类。病例具有多样化的流行病学、临床和病理学特征，单一病因难以解释各类猝死的形成原因。

第二，流行病学特点。病区位于边远山区和半山区农村，呈点状分布；主要发病人群为青壮年农民，女性标化年均发病率高于男性，分别为1.5‰和0.97‰；发病时间为雨季，7～8月发生的病例占95%。发病具有村庄和家庭聚集性，聚集性病例占88.5%；非血缘关系（占56.4%）和外地迁入人群（占28%）均有发病。家庭聚集性猝死主要发生于山区，地点相对固定，多年发生，少数民族占70%以上，存在与猝死病例同时发病的存活病例，常有明确的共同生产和生活暴露史；村庄聚集性猝死主要发生于坝区，地点相对不固定，单年次发生，汉族占70%以上，很少出现与猝死病例同时发生的存活病例。

第三，临床学特点。病例既往多无明显病史（11.7%），出现前驱症状者少(38.2%)；70%的死亡在6～17时；急性发病至死亡时间中位数为0.85小时，15.5%的病例倒地即亡；死前主要症状和体征有晕厥、昏迷、抽搐、发绀、呼吸困难、胸闷痛、心悸等。有限的检查资料发现：猝死病例和同发病例心电图改变类型有Q-T间期延长、室速、室颤、ST-T改变、传导阻滞等，临死前心电图为室颤等恶性心律失常；全套生化检测以心肌酶增高最为明显，不同程度地高于正常上限值；心电图和心肌酶结果提示有不同程度的心肌损伤。根据临床表现，绝大多数猝死被认为心脏性猝死，推测猝死是因突发恶性心律失常引起。

第四，病理学和病毒学特点。38例病理检查结果：主要表现为局灶性淋巴细胞浸润性心肌炎（47.4%）、致心律失常性右室心肌病（21.1%）、心脏发育异常（18.4%），多数病例同时存在两种或两种以上病理改变，5个病例同时做了传导系统检查，2例有阳性发现。38例中未发现克山病病理表现。早期4起事件肠道病毒分离率较高，但后期事件肠道病毒分离率低；对所有病毒学研究结果进行统计学分析不支持肠道病毒感染与本病相关。

第五，危险因素。初步证实一种俗称为“小白菌”（不同地方俗称不同）的野生蘑菇可能为家庭聚集性猝死的主要直接致病因子，具有心脏基础性疾病等脆弱人群可能是猝死的基础病因。国内外专家对该野生菌尚无科学命名，中科院昆明植物所野生菌形态学专家鉴定其属于沟褶菌属（*Trogia sp.*）的一种；新发家庭聚集性猝死与食用“小白菌”存在关联，现场调查发现该菌生长在山凹、背阴和潮湿环境的腐烂树木上，呈点状分布，未发现其他的共同暴露史；使用“小白菌”提取液灌喂小鼠实验致小鼠死亡；从“小白菌”中分离出了3种水溶性提纯物，查清了分子结构，提纯物也可致小鼠死亡；开展禁食“小白菌”为核心的干预活动已显示出了明显的干预效果，2007～2010年以来在开展干预的发病村庄已无聚集猝死事件发生；同时病理学检查发现，部分猝死者有先天性心脏发育不良、致右室心律失常性心肌病（ARVC）等可导致猝死发生的心肌病。

第六，背景因素。猝死发生地环境存在较广泛的健康危害因子，值得更深入地进行公共卫生研究。通过对猝死者进行心脏病理学检查，以及在病区开展的全死因监测、村民心电图和心肌酶学、环境和人体标本金属离子检测、营养状况调查等，发现聚集性猝死发生地的村民与对照区相比存在超额死亡现象，村民心电图和心肌酶学异常比例较高，心肌损害较为普遍；同时村民营养状况较差，环境和人体中某些金属离子含量较高，这些既可能是猝死高发的背景因素，也是需要高度关注的公共卫生问题。

第七，多种非特异性因素作用于云南心肌病高发地区，可能是少数村庄一过性聚集性猝死的主要形成原因，散发猝死可能有多种疾病组成。如在2010年7月弥勒县发生了一起村庄聚集性猝死，检测发现某死者家中 CO_2 浓度严重超标；2010年8月在开远县发生一起人和动物猝死的事件，在发生猝死的现场进行气体检测发现死亡地山沟底部 O_2 浓度低至可以令人窒息的程度，同时伴有 CO_2 浓度严重超标。

猝死是一个世界性的医学难题。据国外统计，全世界每年有数百万人发生猝死，其发生率占总死亡人数的15%～30%。我国的猝死发生率据估计为1.0%～3.6%，在老年人中可达2.3%～5.8%。美国有研究表明冠心病及其并发症导致的猝死占心脏性猝死的80%，心肌病占10%～15%，其他心血管疾病占5%～10%。国内尸检证实心脏性猝死中冠心病占41.7%～61.7%。非心脏性死亡中

主要包括以下几种疾病：急性胰腺炎、脑卒中、糖尿病、睡眠呼吸暂停综合征、遗传性疾病等。而且一般所见的猝死是散发性的，即无时间、空间、家庭和村庄聚集性。

我们认为，下一步研究的重点是“小白菌”所致聚集性猝死的致病机制、诊断标准和救治、村庄聚集性猝死的成因和基础性疾病的病因学研究等。完整地揭示云南不明原因猝死的病因不但是解决本病预防控制的关键，而且对散发性猝死的病因和预防也将起到积极的推进作用。因此，需要继续加大力度开展新发事件现场流行病学研究、病例标本采样研究和病区环境调查研究，以进一步确认已发现的危险因素，继续探索可能存在的其他危险因素；开展对“小白菌”的实验研究，搞清其对人的危害性和机制；继续开展病例的临床研究，以阐明本病的临床特征，提出诊断标准和治疗原则；开展危险因素的现场干预研究，从另一方面寻找支持病因的证据，以最终解决其病因问题。

参考文献

黄文丽，李兆祥，杨林，等．2007．云南省2002～2004年不明原因心源性猝死事件流行病学和临床特征分析．中华流行病学杂志，28(3)：233～236

黄文丽，自登云，侯宗柳，等．1994．一次病毒性心肌炎爆发流行的病原学研究．云南医药，15(2)：143～145

任金马．2007．云南不明原因猝死的流行病学研究．北京：中国疾病预防控制中心

申涛，施国庆，黄文丽，等．2010．云南省35个村不明原因猝死发病特征分析．中国公共卫生，26(2)：237～238

施国庆，张健，黄文丽，等．2006．云南省116例不明原因猝死回顾性研究．中华流行病学杂志，27(2)：96～101

徐昌，陆步来，龙江，等．2009．2004～2008年云南省不明原因猝死病区居民的全死因分析．疾病监测，24 (6)：435～455

张健，施国庆，黄文丽，等．2008．云南省七个家庭不明原因猝死的临床研究．中华心血管病杂志，36(7)：613～617

Richard Stone. 2010. Will a midsummer's nightmare return? Science, 329：132～134

撰稿人： 黄文丽[1]　曾　光[2]

1 云南省地方病防治所

2 中国疾病预防控制中心

乙肝病毒母婴阻断：待解谜团仍不少

Prevention of Hepatitis B Virus Transmission from Mother to Child：The Successes and Challenges

母婴传播是我国乙肝病毒最主要的传播途径之一，由此途径所导致的乙肝病毒慢性感染者约占我国乙肝的一半。在产前、产时或产后，妈妈均可以将乙肝病毒传给孩子，但大部分的母婴传播发生在围生期，即妊娠满28周至产后7天这个阶段。世界卫生组织报告指出，乙肝表面抗原（HBsAg）和HBeAg双阳性母亲所分娩的新生儿，生后若不采取任何免疫预防措施，约90%可成为慢性乙肝病毒感染者，其中有1/5～1/4最终会发展为乙肝病毒相关的肝硬化或肝细胞癌。因此，阻断乙肝病毒的母婴传播是从源头上预防和控制乙肝流行的关键途径之一 。

新生儿接种乙肝疫苗是阻断乙肝病毒传播的最有效方法，单用乙肝疫苗阻断母婴传播的成功率在85%以上。乙肝疫苗联合注射乙肝免疫球蛋白（HBIG），可进一步提高母婴阻断的效果，阻断成功率可达90%以上，因为免疫球蛋白可迅速中和新生儿身体里出生过程中来自母亲血液中的乙肝病毒。这一观点已被多个研究结果证实，也为学术界所公认，因而一些国家和地区还推荐婴儿出生后立即注射HBIG。

在我国，经过多年的实践和宣传，新生儿乙肝疫苗预防接种早已深入人心。然而时至今日，围绕乙肝病毒的母婴阻断，仍有很多未解的谜团和亟待解决的问题，并成为学界长期争论的焦点问题。

1. 阻断失败的比例到底是多少

目前多数人认为乙肝病毒表面抗原（HBsAg）阳性母亲所分娩的婴儿经乙肝疫苗和HBIG主被动联合免疫后，阻断成功率可高达95%以上。但事实上，目前我国的免疫阻断失败率并不准确，可能要高于以前的报道和多数人的估计。

主要原因有以下几个方面：上述结果多是基于较早的研究数据，而既往由于检测方法、试剂等技术原因，灵敏度较低，一部分已发生免疫失败的婴儿未被检测出来；同时国内多数研究结果仅仅统计了有随访的那部分资料，而免疫失败者恰恰可能在失访的人群中居多；国内的研究结果多是在大城市、大医院完成的，而这些医院母婴阻断综合措施一般比较规范到位，而其他医院并非都能如此。

此外，我们既往也多引用国外的统计数据，但国外HBsAg阳性孕妇情况与国内并不相同，如HBeAg阳性者在乙肝病毒感染者中的比例偏低等。近年的一

些国内外研究结果也提示，HBsAg 阳性孕妇分娩的新生儿即使出生后立即给予现有的主被动联合免疫，仍有大约 10% 的婴儿发生免疫失败。因此，我国母婴阻断失败的确切情况仍需要大样本、多中心的随访才能获知。

但针对这一特殊人群进行的任何大样本、多中心研究，在试验设计、质量控制、伦理等方面都有相当难度。

2. 宫内感染概念该如何界定，感染的机制不明

有学者认为，免疫阻断失败的主要原因之一是宫内感染。但哪种情况属于宫内感染，是出生时乙肝病毒标志阳性，还是生后 1 个月、6 个月？目前没有统一的标准。要解决这些问题并不容易，需要在新生儿刚出生注射预防针前、出生后不同节点反复采血检测，难度可想而知。

宫内感染的具体机制目前尚未明确，有研究认为乙肝病毒宫内感染可能与胎盘因素有关，还有研究提示可能是病毒因素或是遗传易感因素所致。而只有通过多学科、多领域、多专业联手协作，对宫内感染的问题进行深入研究，才能阐明乙肝病毒宫内感染机制及导致母婴阻断失败的主要因素。这个问题解决了，乙肝母婴阻断的“死角”才会更小。

3. 干预措施能否提到产前实施

对于已发生宫内感染的婴儿，目前的免疫阻断措施无效，同时也无特效的补救措施。为此，有人建议在产前（妊娠后 3 个月）给孕妇注射 HBIG 或者口服核苷（酸）类似物抗病毒来降低宫内感染发生率。但对于在产前进行干预能否明显降低阻断失败率或宫内感染，目前国内外仍没有具有足够说服力的研究结果给予支持。另外，产前给孕妇口服抗病毒药物的安全性，也是令不少学者担心的问题。

问题是，开展这样的研究存在诸多困难与风险，例如，孕期用药过早会伤及胎儿发育，用药太晚效果可能不好；此外，还有卫生经济学与伦理学的问题。

4. 目前免疫阻断方案是否需要优化

虽然现行的免疫策略阻断乙肝病毒的母婴传播取得了较好的效果，但还不甚理想，每年仍有一定比例的婴儿出现免疫失败。此外，尚有一部分婴儿在完成计划免疫后却不产生保护性抗体（无应答）或抗体水平很低（低应答），生后密切与阳性的妈妈接触还是有被感染的可能。

国内外一些研究结果已表明，增加疫苗剂量可明显提高疫苗的免疫效果和抗体水平，并且安全性良好。因而有学者提议将目前的免疫策略方案进一步优化，让 HBsAg 阳性孕妇所分娩的婴儿通过提高疫苗剂量来降低母婴阻断的失败率以及改善婴儿的应答水平和保护持久性。但疫苗剂量到底多大合适，优化方案能否在更大的范围内普遍开展，其中有没有潜在的风险等，还有待于多中心、大样本的临床研究结果。

但这样的研究，在随机化分组、标本检测的标准化、随访管理等诸多方面的困难可想而知。

总之，关于乙肝病毒母婴传播及阻断研究，近年国内外学者进行了多项研究并取得了初步结果，但在多个方面迄今尚未达成共识。主要原因之一在于缺乏规范的前瞻性、多中心、大样本、长期随访研究的结果，而且开展这些研究十分困难。

因此，下一步的研究方向应主要包括：①通过严格设计的前瞻性结合回顾性研究，弄清目前乙肝病毒母婴阻断失败的确切基数；②通过不同学科联合，阐明宫内感染的途径和原因，为更有效的预防提供理论与实验基础；③尽快摸索出能进一步提高阻断效果、减少母婴传播的优化方案。

参考文献

姚光弼. 2004. 临床肝脏病学. 上海：上海科学技术出版社，363～364

EASL. 2003. International consensus conference on hepatitis B. J Hepatol，39 (Suppl)：S3～S25

Gatta A，Giannini C，Lampertico P，et al. 2008. Hepatotropic viruses：new insights in pathogenesis and treatment. Clin Exp Rheumatol，26 (Suppl 48)：S33～38

Mu SC，Lin YM，Jow GM，et al. 2009. Occult hepatitis B virus infection in hepatitis B vaccinated children in Taiwan. J Hepatol，50：264～272

Song YM，Sung J，Yang S，et al. 2007. Factors associated with immunoprophylaxis failure against vertical transmission of hepatitis B virus. Eur J Pediatr，166：813～818

Xu WM，Cui YT，Wang L，et al. 2009. Lamivudine in late pregnancy to prevent perinatal transmission of hepatitis B virus infection：a multicentre，randomized，double-blind，placebo-controlled study. Journal of Viral Hepatitis，16：94～103

Yao JL. 1996. Perinatal transmission of hepatitis B virus infection and vaccination in China. Gut，38：S37～38

Yuan J，Lin J，Xu A，et al. 2006. Antepartum immunoprophylaxis of three doses of hepatitis B immunoglobulin is not effective：a single-centre randomized study. J Viral Hepat，13：597～604

Zhu QR，Yu GJ，Yu H，et al. 2003. A randomized control trial on interruption of HBV transmission in uterus. Chin Med J (Engl)，116：685～687

撰稿人：段钟平　张　华

首都医科大学附属北京佑安医院

人体劳动能力的生物局限性问题

Human Performance and Biological Limitations

1. 背景

活动是人体进化的原动力，有目的的活动称为劳动（广义的劳动），氧-代谢-能量系统是促进和维系生命、进化、劳动的物质基础。但人体从事任何劳动的能力和潜力都是有限度的，表现为不适应、过劳、衰竭等。与近代科学技术的发展相比，人体劳动能力、潜力的进化远远滞后于科学和技术的发展，人体劳动能力的生物局限性已经成为适应社会劳动发展需求的主要限制因素。实际上，世界各国不是因为人体具有生物局限性来限制劳动系统的发展，而是在不断拓展新的劳动系统，对人体劳动的能力不断提出新的需求。人体劳动能力生物局限性的科学基础是什么，能否利用现代生物技术和（或）超生物技术拓展人体功能？这是一个重要的科学难题。

2. 科学意义

人体劳动能力生物局限性的直接后果是劳动效率下降，职业损伤和疾病增加，劳动设备的非正常损坏增加，甚至引发劳动系统中重大灾难性事故发生等。传统生物学研究发现，限制人体劳动能力的“短板”不像物理学的“短板”那样简单。因此，以系统生物学理念深入探索限制人体脑力、体力和智力能力的科学基础，探索以现代生物技术及超生物技术拓展人体劳动能力，对重塑人体的能力和潜力，改变人们对人体能力限制的认识，防止劳动系统中事故，甚至重大灾难性事故的发生有科学意义。

3. 最新进展

对地球沉积岩石追溯到 6 亿年前的分析研究发现，地球一直有氧气（O_2）存在，氧分压在 20% 左右，且在 3 亿年前，出现一次高峰，氧分压接近了 40%。可能正是 O_2 的存在及氧分压峰值的出现促进了生物体的进化，使生物体具备了利用 O_2 对有机物进行生物氧化的能力，即对营养物进行生物氧化磷酸化，产生能量（ATP）和 CO_2。ATP 是维系一切进化、生命和劳动的物质基础，即有氧代谢（aerobic metabolism）系统。相对有氧代谢系统，机体还存在一个无氧代谢（anaerobic metabolism）系统，特点是迅速分解葡萄糖，产生乳酸和少量 ATP。值得关注的是，此系统不直接依赖于 O_2 的存在，且乳酸的蓄积可改变机体的内环境，影响机体细胞发挥正常功能。无氧代谢的生物学价值是应对生物体对能量快速需求。但无氧代谢能迅速消耗葡萄糖并改变机体内环境，是一条应对

急需但不经济的代谢途径，其代谢产物最终还要通过有氧代谢系统进行彻底氧化。因此，可以推测无氧代谢是机体进化中应对机体活动需要，对有氧代谢功能的一个补充代谢机制。以氧-能量代谢为基础，经历了数亿年演变进化的过程，进化为现在的人体。德国生物学家海克尔提出的重演论，证明了“个体发展是系统发展史的简单而迅速的重演”。根据重演论，个体的发展是在重演人类的进化过程，今天的人类是生物在地球上从单细胞到多细胞、从低等生物到高等动物，从简单到复杂、从低级到高级的漫长历程，展示了生命进化的无限发展趋势。进化的原动力是社会劳动需要，进化的人体具备了神经-内分泌网络系统、呼吸系统、心血管系统和骨骼肌肉等系统。这些系统和组织及其功能发挥是维系生命、适应社会劳动所必需的。用“木桶效应”评价人体的劳动能力，机体的器官、系统是构成“木桶”的木板，其中的“短板”就是影响人体劳动能力的限制因素，如不同研究发现的神经调节限制、心血管功能限制、氧-能量代谢限制、骨骼肌肉结构和承受力限制等。不同劳动需求有不同的限制，如生物力学创始人之一吉迪 · B. 阿瑞认为，若 100m 速度超过 9.6s，肌肉收缩所产生的力量足以造成股四头肌腱和膝盖连接点撕裂。实际上每一器官、系统又是由结构、功能、代谢、调节等多因素构成的“小木桶”，发现并补充其中的“短板”是提高器官和系统功能的重要措施。传统的生物学研究一直在探索和发现这些“短板”，并通过补充、刺激、调节和优化等措施，克服人体劳动的生物局限性，提高人体的能力和素质，适应社会劳动的需要。但科学家们目前已经认识到，由于行为意识、神经-内分泌网络系统的存在，使得人体的“木桶效应”不像物理学上“木桶效应”那样简单。人体功能“木桶效应”的大小、“短板”的构成均在行为意识、神经-内分泌网络的调节下有很大的伸缩性。因此，如何利用系统生物学理念，阐明人体劳动的生物局限性仍然是生命科学面临的难题之一。即便是发现并利用生物学措施克服了某些生物学本身的限制，也只是使人体劳动能力越来越接近人体的生物学极限，使人体的劳动能力越来越接近“木桶”的顶端，这个顶端是人体经过数亿年进化形成的。尽管按照进化论的观点，只要人类继续生存下去，进化就不会停止。但用这种不断进化的趋势来推测未来的人类功能将会发展进化到什么地步，是今天的人们所无法预料的。目前，科学家们已经认识到人类功能的进化速度远远滞后于社会生产需求的发展速度。人体“木桶”的最大效应仍不能适应社会劳动发展的需要时，能否以生物学为基础，利用现代生物学和（或）超生物技术把人体设计成一个更大的“木桶”，以适应快速发展的社会劳动需求，这是一个值得探索的问题。

2010 年 5 月 21 日，Craig Venter 等成功制造出全球首个“合成细胞”——一种称为丝状支原体的细菌。这是一种由人工合成的基因组所控制的单细胞生物，是地球上第一个由人类制造的能够自我复制的新物种。这一技术为人类提供了一种前所未有的能力，能迅速让一个基因组产生许多变化，并添加一些在自然

界中不存在但可能设计出来以执行有用功能的 DNA 片段。英国牛津大学的伦理学教授朱利安·萨乌莱斯认为“此举向创造具有能力的生物和构建永远不可能自然进化的‘自然界’迈出了一步”。2002 年，Lin 等利用转基因技术，改变了 Pgc-1（peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator 1）转基因鼠的肌肉纤维类型，使转基因鼠的白肌向红肌转化，从根本上提高了肌肉纤维有氧代谢能力。这是利用现代生物技术，以现代生命科学为基础，结合其他基础科学的原理，按照预先的设计改造生物体功能的研究有标志性作用的成果。可以预测，随着基因工程、细胞工程、酶工程和蛋白质工程的发展，针对人体的生物局限性，设计改造生物靶标，并利用系统生物技术来部分和更大程度地改变人体的劳动能力是完全可能的。进入 21 世纪后，美国高级研究计划署（DARPA）正式提出了超生物革命计划（beyond the bio-revolution），目的是克服人体的生物局限，维持人体的劳动能力。超生物革命计划是利用工程学、材料学、信息学及模拟仿真等技术，一是探索生物学与物理学、工程学的接口，收集、破译生物电信号的序列，以人为地操纵包括人类意志在内的生物活动，克服人体的生物局限性，这方面研究已获得有价值的研究进展；二是直接为人体提供动能，提高人体力量、耐力，拓展机体进行极限劳动的生物局限性。似乎超生物技术研究尽管面临许多问题，但相对现代生物技术在人体的应用更直接，发展也更快，对实现现代劳动系统中的“超人”计划有更现实的前景。

4. 主要难点

针对人体劳动的生物局限性，利用系统生物学理念，探索人体体力、脑力和智力的生物局限性、可塑性的科学基础及规律，利用生物信息等交叉技术探索生物学与物理学、工程学的接口，收集、破译生物电信号的序列，以拓展包括人类意志在内的生物活动能力，改变人们对生物学限制的认识，克服人体劳动的生物局限性。

参考文献

Lin. 2002. Role of PGC-1 in muscle fiber transformation and mitogenesis. Nature, 418: 797～801

Macarthur DG, North KN. 2005. Genes and human elite athletic performance. Hum Genet, 116(5): 331～339

MacArthur DG, North KN. 2007. A genetic influence on muscle function and athletic performance. Exerc Sport Sci Rev, 35(1): 30～34

撰稿人：刘洪涛
军事医学科学院卫生学环境医学研究所

多环芳烃致癌的危险性评定

Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons as a Carcinogen

自1930年以来，多环芳烃（polycyclic aromatic hydrocarbon，PAH）一直是化学致癌研究领域极为重要的课题。人类PAH接触是导致肺癌的主要原因，已列入IARC人类致癌物。PAH通过不同途径进入机体，产生环境-机体应答反应，引发机体损伤-防御的交互作用，存在接触、效应和易感性多种生物标志物的参与。这种机体交互作用是从暴露、内剂量、生物有效量、早期生物学反应、结构或功能改变到疾病发生的多阶段过程。多环芳烃致癌的危险性评定与预警，亟须解决不同阶段关键指标的确认及其危险性权重或其数量关系，即PAH致癌的暴露评定和危险表征描述与评价问题。

PAH在环境中是微量的，但分布很广，人们能够通过大气、水、食物、吸烟等途径摄取。外暴露与内暴露以及相互之间的关系是危险性评定中暴露评定的重要环节，由于环境中PAH分布和进入体内途径复杂，外暴露评定很困难，选用何种内暴露指标（内剂量或生物有效量）替代外暴露是解决PAH致癌危险性暴露评定的关键问题。目前的研究表明，人体尿中PAH代谢产物可作为评价PAH近期暴露的生物学标志，包括1-羟基芘（1-OHP）、1-羟基芘葡萄糖苷酸（1-OHP-gluc）、3-羟基苯并［a］芘和许多其他羟基PAH。尿中1-OHP为其主要形式，在一定程度上能反映焦炉工人PAH近期接触的内剂量，但不能反映长期接触剂量。DNA是PAH致癌的重要靶组织，多数化学物在诱变中首先与DNA形成加合物，若在细胞分裂前DNA没有进行有效修复或被错误修复，则可成为突变、恶性转化的基础，有可能启动致癌作用。多数研究认为，BPDE-DNA加合物和其他PAH环氧化物-DNA加合物量是PAH致癌的生物有效量或靶剂量。由于外剂量评定的困难，PAH代谢产物（内剂量）和PAH环氧化物-DNA加合物（生物有效量）的不确定性，使PAH外暴露剂量、内剂量和生物有效量之间的数量关系成为解决PAH致癌暴露评定的棘手问题。

人体对致癌物产生的生物学、生物化学反应称为生物学效应。生物学效应包括染色体异常、DNA损伤、癌基因激活、抗癌基因失活及表达蛋白产物量构成的变化。PAH致癌过程同样经历了这些致癌过程的早期生物学改变，是化学致癌过程中正常细胞向癌细胞转化的重要环节，在PAH致癌的剂量-反应关系评定中发挥重要作用，是PAH致癌危险性评定与预警的早期生物学改变指标。明

确生物有效量和这些早期生物学改变的数量关系及其在致癌过程中的权重是目前研究 PAH 致癌危险性评定与预警亟待解决的问题。多数研究表明 PAH 接触后的染色体异常改变（如染色体畸变、姐妹染色单体互换、微核）、DNA 损伤与突变（如 ras 基因家族突变、p53 等）是未来癌症危险有关的早期生物学效应标志。但问题的难点是，这些生物学效应标志中哪些指标是可用于 PAH 致癌危险性评定的金指标及这些指标代表致癌危险的生物学权重。

人类正常细胞存在一整套复杂、有效的 DNA 修复系统，以保证细胞正常复制。修复系统中任何一个基因表达降低或功能缺陷都将影响对 DNA 的修复，即 DNA 修复能力（DRC）的强弱是维持细胞正常功能的中心环节。DNA 修复基因的多态性可能是决定肿瘤易感性的重要因素。目前研究常见的修复基因有涉及碱基切除修复（BER）的基因 hOGG1 和 XRCC1；涉及核苷酸切除修复（NER）的基因 ERCC2、XPA 和 XPG；涉及双链断裂修复（DSBR）的基因 BRCA1、BRCA2 和 XRCC3；涉及错配修复（MMR）的基因 MLH1、MSH2、PMS2 和 MSH6。从这些修复基因中，寻找针对 PAH 致癌有代表性、特异性的修复基因，研究其在致癌过程中的特异作用及权重是目前 PAH 致癌应解决的难点。

综上所述，PAH 致癌是一个复杂的，受内、外源性因素影响的多阶段过程。参与其致癌过程的生物学标志及其在致癌过程中的作用十分复杂，从环境 PAH 的暴露、代谢活化、DNA 损伤、修复到癌症的早期生物学效应乃至临床癌症的发生，每一个过程都有不同的生物学标志参与其作用。同时，癌症的整个发展过程中还受年龄、性别、个人生活习惯、饮食习惯等多种因素的影响。因此，内、外暴露定量模型的建立，参与致癌过程的各类代表性指标的有效性确认，包括从内暴露、代谢、损伤、修复、早期生物学改变到临床疾病发生等一系列过程中的生物标志，这些生物标志物的生物有效量及其不确定性，致癌各阶段生物学指标的相互定量关系及其权重，多阶段统计学模型的建立等，是 PAH 致癌危险性评定亟待解决的难题。

参考文献

冷曙光，郑玉新，攀祖飞，等. 2004. 焦炉作业工人外周血淋巴细胞染色体损伤的遗传易感性研究. 中华预防医学杂志，38(2)：94～97

冷曙光，郑玉新，张文众，等. 2004. 焦炉工外周血淋巴细胞遗传物质损伤水平的研究. 中华劳动卫生与职业病杂志，22(1)：29～32

吴钢，何俊. 2005. DNA 修复酶基因多态性与肺癌易感性研究进展，环境与职业医学，22(5)：473～475

Brescia G，Celotti L，Clonfero E，et al. 1999. The influence of cytochrome P4501A1 and glutathione S-transferase M1 genotypes on biomarker levels in coke-oven workers. Archives of Toxicology，73(8～9)：431～439

Hagmar L ,Brogger A ,Hansteen IL ,et al. 1994. Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes :nordic study group on the health risk of chromosome damage. Cancer Research ,51(11):2919～2922

Liou SH ,Lung JC ,CHEN YH ,et al. 1999. Increased chromosome-type chromosome Aberration frequencies as biomarkers of cancer risk in a blackfoot endemic area. Cancer Research, 159(11):1481～1484

Massion PP ,Carbone DP. 2003. The molecular basis of lung cancer :molecular abnormalities and therapeutic implications. Respiratory Research ,4(1):12

Miller DP, liu G, Immaculata DV, et al. 2002. Combinations of the variant genotypes of GSTP1, GSTM1 ,and P53 are associated with an increased lung cancer risk. Cancer Research ,62:2819～2823

Poirier MC. 1994. Human exposure monitoring ,dosimetry ,and cancer risk assessment :the use of antisera specific for carcinogen-DNA adducts and carcinogen-modified DNA. Drug Metabo Revi ,26(1&2):87～109

Smith LE ,Denissenko MF ,Bennett WP ,et al. 2000. Targeting of lung cancer mutational hotspots by polycyclic aromatic hydrocarbons. Journal of the National Cancer Institute ,92(10):803～811

撰稿人：王忠旭

中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所

工作相关局部肌肉疲劳与损伤的工效学负荷问题

The Ergonomic Load Problems of Work-Related Partial Muscle Fatigue and Disorders

负荷低、节奏快、重复高、时间长、强迫体位等是现代工业生产线劳动和办公室作业的主要特点，极易引发作业人员局部肌肉疲劳，如此长期慢性累积，最终导致工作相关肌肉骨骼损伤（work-related musculoskeletal disorder，WMSD）。WMSD是一类最常见的职业性伤害，根据损伤部位的差异，一般分为下背痛（low back pain，LBP）、腕管综合征（carpal tunnel syndrome，CTS）和颈肩腕综合征（neck-shoulder-wrist syndrome）。因其发病率高、危害大，无论在发达国家还是在发展中国家，都居于最重要的职业健康问题之列，成为当今国内外重点关注和亟待解决的职业卫生问题。美国国家职业安全与卫生研究所（NIOSH）已将此类疾患列为现代劳动卫生领域的十大难题之一。

过度用力后的肌肉显微图像表现出病灶性的肌原纤维和细胞支架的损伤，其发生原因和过程有三种解释：力学负荷、代谢因素和微循环障碍。力学负荷是肌肉损伤的决定因素，高强度力能够破坏肌膜、肌浆网膜、肌原纤维，或通过磷脂酶溶解肌膜结构成分。此外，长时间、低强度的力学负荷也是导致肌肉损伤的原因。影响肌肉损伤的代谢因素主要有局部高温、氧自由基增多、低pH、能量供应不足、钙离子（Ca^{2+}）聚集等。局部工作肌肉温度升高影响蛋白质结构，能量消耗引起ATP供应不足，酸性代谢产物（如乳酸）增加引起pH下降，以及氧自由基代谢和脂质过氧化增加等都可影响肌纤维结构的稳定，导致肌肉损伤。研究表明，静力负荷收缩肌肉的挤压，会使微循环发生阻滞，引起代谢改变，使肌细胞内自由基产生增多和Ca^{2+}过度增高。其中，Ca^{2+}过度增高在损伤过程中起着关键性的作用。进一步研究表明，肌肉疲劳会使肌肉维持工作的能力下降，对骨和关节的支持作用也相应降低，因而大大增加了肌肉和骨关节在外负荷作用下损伤的危险性。WMSD一般是在长期疲劳积累的情况下发生的，因此，肌肉的疲劳可能是引发WMSD的前提。如何从发病机制上解释“肌肉负荷—肌肉反应—肌肉疲劳—损伤”，其代表性、特异性指标有哪些，它们之间的关系如何，这是解决肌肉骨骼损伤防治工作的难题。

WMSD的发生与多种危险因素有关，归因于每种危险因素的权重对于科学

家和决策者在界定损伤性质和程度，以及制定降低伤害发生措施等方面具有重要的作用。WMSD 相关的工效学因素主要包括：①生物力学因素（用力/受力负荷、静力负荷、作业体位、重复动作等）；②环境因素（振动、噪声、温度、人机界面尺寸等）；③工作组织因素（作息时间分配、作业方式、作业时间、重复动作频率、生产速率等）；④社会心理因素（精神紧张、工作快节奏、单调工作、生活压力等）；⑤个体因素（性别、年龄、工龄、人体尺寸等）。其中，局部肌肉用力/受力负荷过大、时间过长、重复频率过高是造成慢性肌肉骨骼损伤的三个基本因素；同样，不良的作业体位也是诱发 WMSD 的重要原因。此外，职业性精神紧张、抑郁、不良环境、工作安排不当、工作超时、不良人机界面设计等在慢性 WMSD 发生中也起着重要作用。明确职业性有害因素与发病的接触-损伤关系；筛选作业场所诸多影响因素中与 WMSD 发生密切相关的特异性的不良工效学因素，并定量分析这些不良因素对局部肌肉反应及疲劳程度的影响，是确定 WMSD 的职业接触-损伤关系的重要环节。

目前，从“工效学负荷—肌肉反应—疲劳或损伤（WMSD）”发病模式，解决 WMSD 发病机制，提出危险性评价指标体系并建立其数量关系是防治 WMSD 的难题。解决问题的难点是针对不同类型 WMSD，确认其特异性工效学因素，如何将三维摄像动作捕捉系统、LifeMOD 人体动力学仿真和模拟仿真测试评价系统有机结合，将现场实际操作引入实验室来开展可控负荷测试下的实验室模拟研究，并运用 sEMG 技术、生理生化技术、分子生物学检测技术探讨“工效学负荷—肌肉反应—疲劳或损伤（WMSD）”发病机制，建立相互之间的剂量-反应关系。

参考文献

刘长俊，郭怀兰，王建洲．2004. 职业性肌肉骨骼疾患的研究进展．郧阳医学院学报，23(2)：119～121

张竞，韩旭，文桂林．2008. 基于 ADAMS. LifeMOD 的人体头颈部动力学仿真与验证．系统仿真学报，20(10)：2718～2721

Bart Visser, Jaap H, van Dieen. 2006. Pathophysiology of upper extremity muscle disorders. Journal of Electromyography and Kinesiology, 16: 1～16

David GC. 2005. Ergonomic methods for assessing exposure to risk factors for work-related musculoskeletal disorders. Occupational Medicine, 55: 190～199

Garder N. 2006. How to assess work-related musculoskeletal disorders (MSD). Prevention En-pratique Medicale, 10(1): 1～4

Hägg GM, Luttmann A, Jäger M. 2000. Methodologies for evaluating electromyographic field data in ergonomics. J Electromyogr Kinesiol, 10: 301～312

Luttmann A, Jäger M, Laurig W. 2000. Electromyography indication of muscular fatigue in occu-

pational field studies. Int J Ind Ergon, 25: 645～660
Westgaard RH. 2000. Work-related musculoskeletal complaints: some ergonomics challenges upon the start of a new century. Applied Ergonomics, 31: 569～580

撰稿人：王忠旭
中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所

噪声与有机溶剂对听力损伤的联合作用

The Combined Effects of Noise and Organic Solvents on Auditory Dysfunction

1. 背景

噪声与有机溶剂（如甲苯、二甲苯、正己烷等）是作业环境中最为常见的物理性和化学性职业危害因素，职业接触人数众多。在全世界，生产和生活中使用的有机溶剂有8万种之多；有超过6亿以上劳动者的作业环境中存在噪声。在我国，作业场所噪声和有机溶剂危害面极广，职业性噪声造成的噪声性听力损失（noise-induced hearing loss，NIHL）和有机溶剂暴露导致的职业性中毒已成为危害劳动者健康的最普遍职业病。传统职业医学认为，这两种不同性质的职业危害因素对人体健康的影响属于独立作用。但近年来研究报道显示，噪声与有机溶剂对听力损伤可能存在联合作用。

2. 科学意义

众所周知，职业性噪声可特异性损害耳蜗，从而引起可逆性或不可逆性听力损失。20世纪80年代以来，有机溶剂的耳毒性逐渐引起人们的关注。有机溶剂的耳毒性包括耳蜗毒性、前庭毒性、前庭蜗神经毒性和中枢神经毒性。与噪声性听力损失相比，有机溶剂不仅破坏耳蜗结构，还损害中枢神经结构和功能，且受损部位多在蜗后，常同时累及前庭功能。有机溶剂和噪声均可损害耳蜗，并且有机溶剂还能影响听神经的结构与功能，这为有机溶剂和噪声的联合作用奠定了基础（图1）。然而，与研究独立作用相比，联合作用研究更为复杂，尤其是对物理和化学两种不同性质健康危害因素的联合作用研究更具有挑战性。开展噪声与有机溶剂对听力损伤联合作用研究工作，有助于更好地了解听力损伤的发生、发展过程及其机制。这不仅可以为职业人群听力损失的预防控制提供科学依据，还可为医学领域内多种健康危害因素混合暴露

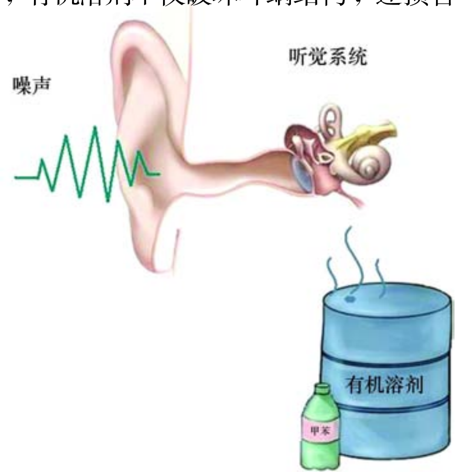


图1　噪声与有机溶剂对听力损伤的联合作用

情况下，疾病发病机制的研究提供借鉴和帮助。

3. 最新进展

有研究报道显示，停止暴露后，有机溶剂的耳毒性仍可延续。具有耳毒性的有机溶剂包括芳香族和非芳香族两大类。芳香族有机溶剂可导致不可逆性听力减退，耳蜗柯蒂器上的毛细胞是芳香族有机溶剂致听力损失的重要毒作用靶点 。芳香族有机溶剂可与细胞膜的膜蛋白结合，触发毛细胞的凋亡，由于毛细胞不可再生，从而导致耳蜗出现不可逆性功能障碍及病理损伤 。对于非芳香族有机溶剂，其主要损伤机制为耳蜗内听神经旁路或耳蜗外听神经旁路的损伤 ，如三氯乙烯可引起毛细胞和螺旋神经节细胞之间的断裂。此外，有机溶剂与神经系统也有较高的亲合性，可导致听觉系统神经细胞与神经纤维发生损伤和变性 。尽管苯、甲苯、二甲苯、三氯乙烯、二硫化碳、正己烷等有机溶剂的耳毒性在大量动物实验中得到证实 ，但有机溶剂耳毒性的人群流行病学证据尚不足 。这是由于存在以上毒物的工作场所往往同时并存生产性噪声，因此有机溶剂单独暴露对听觉系统影响的职业人群流行病学资料较难得到。值得注意的是，有报道显示，即使在容许职业暴露限值 （permitted occupational exposure limit ）浓度以下，有机溶剂和噪声仍具有联合作用 。

4. 主要难点

有机溶剂和噪声联合作用研究的首要问题是流行病学证据不足。许多流行病学研究表明，噪声和有机溶剂具有交互作用，同时存在于生产环境中确实会加重工人听觉系统的危害。但也有一些报道未发现噪声和有机溶剂存在交互作用 。除研究结果的不一致外，有机溶剂和噪声联合作用流行病学研究中还存在 5 个方面的问题。①暴露评估：有机溶剂和噪声暴露评估是计算累计暴露剂量/强度还是当前暴露剂量/强度？高、中、低水平的噪声和高、中、低浓度的有机溶剂如何组合才存在联合作用？有机溶剂是与连续噪声还是与脉冲噪声存在联合作用 ？已有研究结果的差异，可能与有机溶剂和噪声的暴露参数及评估方法不同有关 。②听力损失的测量：听力损失包括传导性听力损失和感音神经性听力损失 。目前听力损失主要有 5 种检测方法：纯音听阈测试法（pure tone audiometry，PTA ）、高频听阈测试法(high frequency audiometry，HFA)、耳语测听法 （speech audiometry)、耳声反射法(otoacoustic emission，OAE)、脑干听性诱发电位法（brainstem auditory evoked potential，BAEP)。PTA 可测明显的听阈位移，但主观性较强；OAE 和 BAEP 较为客观，可检测耳蜗及蜗后的损伤。如何针对不同的听力损失部位和类型 ，选择早期、敏感、客观的听力损失测量方法，尚需进一步研究。③混杂因素：听力损失的影响因素较为复杂，年龄、耳毒性药物、高温、吸烟、饮酒、相关疾病等都可能成为混杂因素。如何排除混杂因素的作用，分析出联合作用，是相关研究的难点之一。④对照组的选择：由于在职业人群中选取单纯性有机溶剂暴露组非常困难 ，多是通过比较联合暴露与单纯噪声暴露职业人群的听力损害情况 ，来进行职业流行病

学研究。⑤研究类型：有机溶剂和噪声联合作用研究大多为病例对照研究，队列研究少有报道。从上述情况可见，有机溶剂和噪声联合作用的相关研究中研究参数差异较大，以致难以对研究结果进行比较，且人群获得的数据分析难度大，亟待通过科学严谨的设计，获得可靠的流行病学结论。

有机溶剂和噪声联合作用的动物实验研究结果是对人群流行病学研究的有益补充，多数动物实验结果显示噪声与有机溶剂同时暴露可能存在协同效应。但动物实验造成听力损伤的有机溶剂和噪声的浓度/强度很高，如何将有机溶剂和噪声联合作用的动物实验结果推导到人群，也是研究人员所面临的一个难题。

5. 展望

目前，有机溶剂和噪声对听力损失的联合作用机制尚不明晰。近来的研究发现，甲苯具有抗胆碱能受体样作用，可抑制脑干水平的胆碱能受体，影响电压依从性 Ca^{2+} 通道，抑制具有保护性作用的中耳反射，从而使得过量强度声能进入耳蜗，破坏耳蜗的结构和功能。这一结果可为阐释有机溶剂和噪声的联合作用机制提供了新思路，但具体机制还有待进一步研究证实。

总之，了解噪声和有机溶剂对听觉系统损伤的联合作用机制，不仅能丰富劳动卫生、毒理学和职业医学的研究内容，同时研究结果对指导职业人群的听力保护、预防听力损失也具有较高的实践价值。

参 考 文 献

陈小霞,叶方立,朱长才. 2005. 噪声与化学毒物联合作用致听力损伤的研究进展. 国外医学·卫生学分册,32(5):281～283

刘移民,李旭东,李永胜,等. 2008. 噪声作业场所环境危险因素对噪声性听力损失的影响. 中华劳动卫生职业病杂志,26(12):721～724

Campo P,Maguin K. 2007. Solvent-induced hearing loss:mechanisms and prevention strategy. Int J Occup Med Environ Health,20(3):265～270

Fuente A,Slade MD,Taylor T,et al. 2009. Peripheral and central auditory dysfunction induced by occupational exposure to organic solvents. J Occup Environ Med,51(10):1202～1211

Hodgkinson L,Prasher D. 2006. Effects of industrial solvents on hearing and balance:a review. Noise Health,8(32):114～133

Maguin K,Campo P,Parietti-Winkler C. 2009. Toluene can perturb the neuronal voltage-dependent Ca^{2+} channels involved in the middle-ear reflex. Toxicol Sci,107(2):473～481

Rabinowitz PM,Galusha D,Slade MD,et al. 2008. Organic solvent exposure and hearing loss in a cohort of aluminium workers. Occup Environ Med,65(4):230～235

撰稿人：贾晓东　刘美霞

上海市疾病预防控制中心

纳米技术职业安全

Safe Nanotechnology in the Workplace

1. 背景

纳米技术作为中国政府中长期战略规划重点资助的领域，与信息技术和生物技术一起，被科学界称为21世纪科技发展的三大支柱。由于物质在纳米尺度（0.1～100nm）下的特殊功能，纳米技术及产品几乎涵盖了国民经济的各个领域。据估计，到2015年，全球纳米电子学领域（半导体、超级电容器、纳米存储和纳米传感器）可实现价值约4500亿美元；纳米材料（粒子、涂料和结构）也可达到4500亿美元左右；全球将有200万工人从事纳米技术产业。据不完全统计，我国纳米产业已超过1000家，并将呈持续上升趋势。纳米材料在生产和使用过程中，可能会带来生产环境及生活环境的污染。纳米材料的毒性数据及暴露评价是评估纳米材料对工人健康风险必不可少的重要组成部分，也是实现纳米技术安全生产的前提。

2. 科学意义

人造纳米材料，如同其他新化学物质，在生产和使用之前，应该清楚材料可能的健康危害以及生产环境材料释放规律、暴露特征和暴露水平。这是制定纳米材料职业卫生标准、健康监护体系及个人防护方案的主要依据，也是纳米材料职业危害风险管理及安全生产的前提。

3. 最新进展

最近十年来，纳米材料毒理学研究取得了一定进展，这为纳米材料职业风险评价及管理奠定了基础。目前已有数据表明，除了纳米材料的剂量和元素组成外，其大小、形状、表面积、表面活性、团聚及其表面电荷与功能基团修饰等因素均会影响纳米材料在生物体内的分布及可能的毒性。对于常规物质的毒性评价，我们经常用质量浓度作为毒理学剂量评价单一参数，但是对于理化表征参数复杂的纳米材料，在确定纳米材料与其生物毒性关系时，需要考虑究竟什么参数（质量、粒径、比表面积等）才是决定其毒性的关键参数，这为认识纳米材料职业健康风险，客观、准确评价职业场所纳米材料暴露水平奠定了基础。

4. 主要难点

为保障纳米技术职业安全，首先需要发展、建立适合纳米材料的检测方法及技术手段，这是当今进行纳米材料毒理学及安全性评价迫切需要解决的问题。对

生产环境空气中纳米颗粒暴露的系统评价，是了解其健康影响的前提，也是评价纳米材料生产环境卫生状况、判断安全卫生控制措施有效性的主要依据。监测的前提是要明确被测量的物质及测量方法。

生产和使用纳米材料的工作场所可能暴露于纳米材料的环节主要包括：①未封闭环境下生产和使用纳米材料；②没有使用适当个人防护措施，接触液体中的纳米材料；③在倾倒或混合或大幅度搅拌纳米材料时，吸入产生的气溶胶；④纳米材料生产设备的维护及废弃材料清理过程；⑤纳米材料粉尘收集系统的清扫过程；⑥含有纳米材料的产品加工、打磨、穿孔或其他机械性粉碎过程。最近，人工混合碳纳米纤维和树脂颗粒的相关研究证实了上述过程潜在的职业暴露。

人们对于纳米材料特别是人工纳米材料在车间空气中的环境行为仍缺乏认识。纳米材料体积小、质量轻，能够长时间停留在大气中；释放入大气后，很快会被周围大气稀释而迅速扩散；纳米材料可能遵循基本的扩散法则，粒径为5nm的纳米材料每纳秒内可发生820万次碰撞，每次碰撞都可能发生凝结和团聚，导致粒径变大，比如碳纳米管会团聚形成直径为20～50nm的纳米束或纳米线。到底哪些因素会影响纳米材料在工作场所的产生、扩散、团聚和参与再循环，我们所熟悉的总悬浮颗粒物、细颗粒物和超细颗粒物的研究结果能否简单地外推到纳米材料，这些都是突破纳米颗粒暴露评价难点的关键问题和线索。

纳米材料的理化表征是揭开纳米材料健康效应的前提条件。我们目前已经拥有一定的表征手段，如观察颗粒形貌的扫描电镜、透射电镜等，但这些设备远没有普及和完善。在进行职业环境纳米材料暴露评价时，颗粒物的收集及颗粒物计数都要考虑到纳米尺寸这一参数，针对微米颗粒的总尘或呼吸性粉尘采样器显然需要更新，而目前用于环境超细颗粒物采集及计数分析的设备，有望用于职业环境纳米颗粒的评价。

车间环境监测的结果，通常需要与职业接触限值（occupational exposure limit，OEL）相比较而进行判断和解释。对于纳米颗粒物，如何使用OEL是首先要解决的问题。同种材料针对微米颗粒的OEL不一定适用于纳米颗粒物。例如，同为碳元素组成的石墨，其OEL（允许接触剂量为$5mg/m^3$）并不适用于纳米碳管的接触评价，因为纳米碳管相对于石墨显现出更强的毒性作用，可以导致实验大鼠肺出现肉芽肿；纳米碳管因与石棉相似，而被高度怀疑可能具有石棉样作用。在同一质量水平，相对于微米颗粒，纳米颗粒的颗粒数增多、表面积增大，若以质量为度量单位，纳米颗粒的接触限值可能要大大降低。为了建立纳米颗粒的OEL，我们需要明确它的基本毒性、接触水平、人群流行病学的接触剂量反应规律，以及确定所识别的风险需要被控制的程度，而上述问题的解决，将使纳米颗粒OEL的制定迎刃而解。

5. 展望

纳米材料的风险管理，应该作为生产或使用纳米材料工厂或企业职业安全和健康方案中必不可少的一部分。风险管理需要我们对存在的风险进行动态观察，系统地收集信息及评价工人与潜在危险因素相互作用的健康效应。为此，需要加强包括职业医学、环境科学、毒理学及纳米科学等多学科合作，加深对纳米材料毒性的认识，加快研发纳米材料暴露评价技术及健康监护技术方案，包括健康监护指标、体检周期及个人防护用品的选择，让纳米技术真正造福于人类，实现纳米技术的职业安全。

参考文献

贾光，郑玉新. 2007. 充分认识纳米材料安全性研究的重要意义. 中华预防医学杂志，41(2)：83～84

Lam CW，James JT，Mc Cluskey R，et al. 2006. A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks. Crit Rev Toxicol，3：189～227

Mazzuckelli LF，Methner MM，Birch ME，et al. 2007. Identification and characterization of potential sources of worker exposure to carbon nano-fibers during polymer composite laboratory operations. J Occup Environ Hyg，4：D125～130

NIOSH. 2009. Approaches to safe nanotechnology：managing the health and safety concerns associated with engineered nanomaterials. DHHS (NIOSH) Pub No. 2009-125

NIOSH. 2009. Progress toward safe nanotechnology in the workplace：a report from the Nanotechnology Research Center：project reports for 2007～2008. DHHS (NIOSH) Pub No. 2010-104

Nowack B，Bucheli TD. 2007. Occurrence，behavior and effects of nano-particles in the environment. Environ Pollut，150：5～22

Schulte P，Geraci C，Zumwalde R，et al. 2008. Occupational risk management of engineered nanoparticles. J Occupy Environ Hyg，5：239～249

Wang X，Jia G，Wang H，et al. 2009. Diameter effects on cytotoxicity of multi-wall carbon nanotubes. J Nanosci Nanotech，9(5)：3025～3033

撰稿人：贾　光[1]　李　涛[2]

1 北京大学

2 中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所

二氧化硅、尘肺与肺癌

Silica，Pneumoconiosis and Lung Cancer

1. 背景

石英（silica，SiO_2）是一种对健康危害严重的职业性危害因素，暴露人群多，危害后果重，不仅可引起肺部纤维性变，而且还可能具有致癌性。1982 年，Goldsmith 等根据流行病学及试验研究证据，提出矽尘直接致癌、矽尘协同致癌及矽尘通过尘肺致癌 3 种致癌假说，并引发一场持续多年的争论。1984 年，在第一次国际石英、矽肺、肺癌学术会议（ISSSC）上大量研究支持 SiO_2 致癌学说。1987 年 IARC 宣布，SiO_2 为动物致癌物，人类致癌性证据不足。1990 年，IARC 发表了大量关于 SiO_2 潜在致癌作用的流行病学研究成果，进一步确定了 1987 年做出的结论。在 1993 年的第二次 ISSSC 会议上，大量动物实验和细胞培养研究证明，SiO_2 可诱导产生氧自由基和 DNA 链断裂。1997 年，IARC 在重新评估 SiO_2 的毒性后，宣布石英、方石英形式的结晶型 SiO_2 为人类致癌物，但尚缺乏人类 DNA 水平的直接证据，有关 SiO_2 粉尘致纤维化与致癌性的关系也一直存在争议。

2. 科学意义

粉尘性质、粉尘分散度、接触浓度及职业防护效果等是影响粉尘致病性的重要因素。其中，游离 SiO_2 含量更为重要，劳动者接触高浓度的含游离 SiO_2 的粉尘不仅会罹患尘肺病，还可能发生癌症。尽管 IARC 已经宣布 SiO_2 为人类致癌物，但尚需要人类 DNA 水平的直接证据。而 SiO_2 致癌机制十分复杂，是一个多基因、多因素、多阶段的过程，有许多有待于深入研究和探讨的问题，如 SiO_2 是通过矽肺致癌，还是直接或间接致癌？SiO_2 致癌的分子生物学基础是什么？科学确证矽尘或矽肺与肺癌的关系，有助于更好地理解尘肺发生、发展机制及 SiO_2 致癌的发病机制，对于科学制定粉尘防治对策，保护劳动者健康具有重要意义。

3. 最新研究进展

一些矽尘与肺癌的流行病学研究结果支持矽尘直接或间接致癌假设。如选择单纯矽尘暴露而其他已知致癌物接触水平很低的采矿业，对 6187 名陶工随访，调整吸烟与居住地影响后发现，60 岁以下工人肺癌的 *RR* 为 1.32，提示接触低水平的矽尘与肺癌发生之间存在相关关系。对耐火材料、铁矿开采、机械铸造及

钢铁冶炼等行业的接尘工人进行的 15 年队列研究发现，接尘人员肺癌危险性明显增高，且与粉尘中的 SiO_2 含量有关，而肺癌的标化死亡率与 BaP 浓度不平行。持反对意见者则认为，IARC 所据流行病学研究存在太多的混杂因素或设计不合理。Mclaughlin 等对 68 285 名工人队列肺癌死亡进行随访，结果发现仅锡矿工人肺癌危险度随接尘水平呈明显上升趋势，而铜铁矿工人和接触 SiO_2 水平最高的钨矿工人则未见此现象。也有学者认为矽尘作为相关的危险因素之一，与众多的职业危险因素和非职业危险因素以复杂的方式相互作用、相互影响。

以矽肺患者为研究对象，以背景人群肺癌死亡率为基础进行的矽尘、矽肺与肺癌流行病学研究表明，矽肺患者人群的肺癌显示超量（SRR＝1.64 或＝2.37），提示矽肺患者中肺癌死亡有增高的危险；而矽尘暴露和肺癌没有关联，提示矽尘暴露直接导致肺癌的可能性很小。在有效控制年龄、吸烟、其他职业性致癌因素及检查偏倚的影响后，肺癌 SMR 增高，肺癌的危险性随着接触时间的增加而增加。这些研究结果支持矽尘通过矽肺致癌的假说。

关于 SiO_2 致癌的细胞及分子机制研究，主要集中在 SiO_2 诱导肺泡Ⅱ型上皮细胞转化与增殖、肺泡上皮细胞间隙通讯功能下调、SiO_2 介导的 DNA 损伤与修复、活性氧自由基对靶细胞的作用、SiO_2 与肿瘤相关基因等领域。一些研究认为肺泡Ⅱ型上皮细胞对 SiO_2 遗传易感，肺泡Ⅱ型上皮细胞在 SiO_2 作用下增殖、增生，并有可能转化为恶性细胞而形成肿瘤。细胞增殖、增生可能与 c-fos、c-jun、c-myc 等早期反应原癌基因激活上调有关。也有研究表明 SiO_2 粉尘具有遗传毒性，可引起 DNA 链断裂及碱基氧化，推测 SiO_2 粉尘的毒性作用主要由自由基介导，DNA 分子是自由基攻击的重要靶分子。关于 SiO_2 与肺癌基因的研究表明，矽肺肺癌组织中 p53 基因突变在外显子，完全有别于普通肺癌，提示 SiO_2 对人类靶细胞 DNA 具有特征性的打击作用。在所研究的 SiO_2 相关肺癌中没有一例发生 K-ras 基因第 12 密码子突变，而在普通肺癌中 K-ras 基因第 12 密码子突变率高达 70%～100%。而且 SiO_2 相关肺癌中 K-ras 基因的突变类型以 G→C 突变为主，而不是普通肺癌的 G→T 突变，提示 SiO_2 具有特异的致癌机制。也有研究表明，SiO_2 刺激的肺泡巨噬细胞上清液能诱导 CCL-64 细胞增殖和 GJIC 功能下调，GJIC 功能与 SiO_2 剂量间呈良好的剂量反应关系。

4. 主要难点

如上所述，IARC 已正式宣布 SiO_2 为人类致癌物。但 SiO_2 是直接致癌，还是通过尘肺致癌？如果通过尘肺致癌，其致病基础、发展机制又是什么？此外，其他形式的 SiO_2 是否对人类也有致癌作用？不同粉尘之间或 SiO_2 粉尘与其他致癌物之间是否具有协同致癌作用？要想确证这种关系，还需要更多、更深入的职业流行病学调查，其难点是如何合理选择有代表性的研究人群和背景人群，排除混杂因素的影响。流行病学研究是认识人群疾病特征的研究，从发现疾病特征到

认识疾病的生物学机制，还需要更多、更深入的分子水平证据，如肺纤维化与肺癌的生物学相关性问题、SiO_2致癌与其他癌基因和抑癌基因的关系、癌基因激活和抑癌基因失活的协同关系、与SiO_2粉尘相关的DNA修复基因的作用机制等。

5. 展望

利用资料齐全的病例-对照样本进行矽尘、矽肺与肺癌流行病学研究，同时整合大样本的接触SiO_2粉尘工人的肺癌危险性研究，有助于确证SiO_2是否通过尘肺致癌。基因组学、蛋白质及细胞信号转导的分子生物学技术的发展将会大大推动SiO_2分子水平致癌机制的研究，有助于在分子水平上取得突破，使粉尘危害的科学预防和SiO_2致癌的早期筛查、诊断成为可能。

参考文献

王德军. 2005. 石英致癌的细胞及分子机制研究进展. 环境与职业医学，22(1)：60～62

张维森，江朝强，Lam TH，等. 2004. 职业接触粉尘与死亡相关的前瞻性队列研究. 中国工业医学杂志，17(4)：215～219

Checkoway H. 1993. Second international symposium on silica. Silicosis&Cancer，29～35

Goldsmith DF，Guidotti TL，Johnston DR. 1982. Does occupational exposure to silica cause lung cancer? Am J Ind Med，3(4)：423～440

Winter PD. 1990. IARC Occupational Exposure to Silica and Cancer Risk. Lyon：IARC Scientific Publications，83～94

撰稿人：李 涛

中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所

职业倦怠生物标志物

Biomarkers for Job Burnout

1. 背景

职业倦怠（job burnout）指个体因不能有效地应对职业紧张，而产生的一种长期、持续性的负性心理反应，主要表现有自觉疲乏、焦虑、压抑、工作能力下降，甚至身心衰竭的现象。它是因长期工作压力过大呈现职业紧张，个体又不能有效应对状况下所引发的身心健康问题。国内对职业倦怠有多种译法，医学界最早译为精疲力竭症，后又称为工作疲竭感，而心理学界也将之称为工作倦怠、职业枯竭等。职业倦怠作为一种疾病也已被医学界所接受，在国际疾病标准编码（ICD-10）命名系统中得到确认，编码为 Z73.0。对职业倦怠的评估虽然有多种不同的观点，但 Maslach 等提出的三维概念得到了广泛认同。其认为职业倦怠包括 3 个维度，即情感耗竭（emotional exhaustion，EE）、人格解体（depersonalization，DP）和个人成就感降低（reduce personal accomplishment，PA）。其核心是情感耗竭，同时患者还伴有如头痛、肌肉疼痛、失眠、记忆力下降、注意力无法集中等自觉症状，呈现疾病状态，严重影响工作效率，故又称为职业倦怠综合征。职业倦怠的评定目前依靠结构化问卷，虽然有多种不同问卷，但 Maslach 开发的 Maslach Burnout Inventory（MBI）是应用最广泛的问卷。最初 MBI 是分护士、教师与社会工作者不同职业的问卷，共 22 个条目，分 3 个维度分别评定。1996 年，由 Schaufeli 与 Maslach 联合开发了通用型问卷（MBI-General Survey，MBI-GS），精简为 16 个条目，可运用于不同人群的评定，并进一步设定了职业倦怠综合分的计算公式与分级评定标准。MBI-GS 已成为国内外所公认的较可靠的职业倦怠评定工具，为职业倦怠在不同人群中的评定提供了基础。

2. 科学意义

职业倦怠作为一种疾病状态已经被国际疾病标准编码（ICD-10）命名系统所接受，从医学临床诊断角度需要寻找一种可靠的、相对特异的临床检测指标作为诊断依据，这就需要去寻找其生物学标志物。鉴于目前职业紧张与高血压、冠心病的关系已经得到确认，作为职业紧张早期效应的职业倦怠的早期识别对预防冠心病的价值是可以预期的。如果职业倦怠的生物标志物能够得到确认，对于职业倦怠的诊断与预防冠心病均具有较高的临床实用价值，同时对于职业人群的健康维护与心血管疾病的早期预防具有广泛的应用价值。

3. 最新进展

职业倦怠的生物标志研究主要关注了职业倦怠对下丘脑-垂体-肾上腺轴（hy-

pothalamus-pituitary-adrenal axis，HPA）主导下的神经内分泌激素的影响，如皮质醇（cortisol）、肾上腺素（epinephrine）、去甲肾上腺素（norepinephrine）等激素分泌增加。这些激素受 HPA 调节，同时受机体生物节律的影响明显，个体自身变化程度比个体间差异更大。最近的皮质醇晨醒反应受到特别关注，皮质醇晨醒反应（cortisol awakening response，CAR）是指晨醒后 30 分钟内皮质醇浓度快速增高的现象。以晨醒后即时的皮质醇水平为基础水平，晨醒 30 分钟时皮质醇水平变化值作为评定指标，可以克服晨醒后时间不同的影响。对晨醒后皮质醇变化水平的影响比皮质醇的绝对浓度影响更有预报价值，需要更多关注皮质醇晨醒反应的变化量，而不是绝对浓度的高低。

职业倦怠与对炎性细胞因子关联的探索：对 167 名德国教师的研究发现，职业倦怠状况与 IL-4、IL-10 及 TNF-α 有关联，但关联均非独立，尚不能作为预报指标。荷兰的研究发现，职业倦怠人群中 IL-10 增高，与对照比较差异有统计学意义，而 TNF-α、IFN-γ 及 DHEAS 等指标差异均未显现统计学意义。对美国宾夕法尼亚 183 名志愿者的研究发现，社会心理因素（职业紧张）与 IL-8 和 IL-6 关系密切，而 TNF-α 和 IL-1β 未显现统计学意义。对上海交警的研究发现，IL-6 浓度随职业紧张程度增加而增加。这均提示可能存在某些指标可作为职业倦怠的生物标志物，但由于其是免疫内分泌指标，影响因素众多，特异性相对较低，增加其作为生物标志物的困难。

另一重要方向是职业倦怠对心脏功能的影响，其中心率变异度受到关注。心率变异度（heart rate variability，HRV）指窦性心率在自主神经调节下发生波动性变化的能力，是连续心搏间瞬时心率的微小涨落。职业倦怠对冠心病风险的预报价值值得关注，对荷兰社区年龄在 41～66 岁的近 3000 名居民为期 5 年的追踪观察结果显示，职业倦怠是心肌梗死的独立危险因素，*RR* 达 3.0 以上，比人们所熟知的行为（吸烟、饮酒、运动不足/静坐生活方式）及高、低密度脂蛋白等危险因素，具有更大的预测价值。职业倦怠与交感神经活动存在关联，并与 HPA 失调有关，这可能与冠心病风险增大有关。

4. 主要难点

虽然近 20 年来医学界和心理学界已经做了相当多的工作，但职业倦怠的生物标志物探索仍存在着相当大的挑战。主要难点有以下两方面：

其一是职业倦怠生物标志物的筛选。因为职业倦怠的症状与体征特异性不强，传统的受 HPA 调节的神经内分泌激素受生物节律影响变化大，而炎性细胞因子影响因素众多；而作为生物标志物本身要求具有较高的特异性和可靠性，即在职业倦怠人群中与一般人群中需要存在明显的差异，有足够的区分能力；并要求指标相对较稳定，具有可重复性。

其二是职业倦怠的生物标志物的参考值范围的界定。现有研究中有关生物指

标的报道均是小样本，作为参考值范围的制定需要有较大的样本量；同时检测对象既要包括职业倦怠的患者，又要包括无职业倦怠的正常人，通过研究其人群分布来确定参考值，以保证其具有一定的灵敏度与特异度。

5. 展望

对职业倦怠生物标志物的未来探索需要重点关注的是皮质醇晨起反应与心率变异度这两个指标，两者受到 HPA 的调节，与职业倦怠的关系密切。同时两者的检测均是非创伤性的，易于被人们所接受。皮质醇晨起反应可收集唾液检测评定；心率变异度的检测是以心电为基础的。而且检测方法均是在现有常规检测的基础上进行调整即可满足，从经济实用角度也是可取的。找出适宜的生物标志物，有利于职业倦怠的确认，对于职业倦怠的早期发现与预防职业倦怠进一步发展具有较高的价值。

参 考 文 献

戴俊明，余慧珠，王祖兵，等. 2006. 职业人群工作疲竭感问卷的信度效度研究. 中华劳动卫生与职业病杂志，24(4)：229～231

戴俊明. 2008. 职业紧张评估方法与早期健康效应. 上海：复旦大学出版社

Chandola T，Britton A，Brunner E，et al. 2008. Work stress and coronary heart disease：what are the mechanisms? European Heart Journal，29：640～648

Haensel A，Mills PJ，Nelesen RA，et al. 2008. The relationship between heart rate variability and inflammatory markers in cardiovascular diseases. Psychoneuroendocrinology，33：1305～1312

Känel Rv，Bellingrath S，Kudielka BM. 2008. Association between burnout and circulating levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in schoolteachers. Journal of Psychosomatic Research，65：51～58

Marsland AL，Sathanoori R，Muldoon MF，et al. 2007. Stimulated production of interleukin-8 co-varies with psychosocial risk factors for inflammatory disease among middle-aged community volunteers. Brain，Behavior，and Immunity，21：218～228

Maslach C. 2003. Job burnout：new directions in research and intervention. American Psychological Society，12：189～192

Mikolajczak M，Quoidbach J，Vantootighem V，et al. 2009. Cortisol awakening response (CAR)'s flexibility leads to larger and more consistent associations with psychological factors than CAR magnitude. Psychoneuroendocrinology，10：1016

Mommersteeg P，Heunen CJ，Kavelaars A，et al. 2006. Immune and endocrine function in burnout syndrome. Psychosomatic Medicine，68：879～886

Wingenfeld K，Schulz M，Damkroeger A，et al. 2009. Elevated diurnal salivary cortisol in nurses is associated with burnout but not with vital exhaustion. Psychoneuroendocrinology，34：1144～1151

撰稿人：戴俊明　傅　华

复旦大学

辐射防护线性无阈假设

Linear Non Threshold Hypothesis for Radiation Protection

1977 年，国际放射防护委员会（ICRP）发表了第 26 号出版物，对辐射防护体系进行了革命性的变革，把辐射效应分为随机效应（stochastic effects）和非随机效应（non-stochastic effects）。随机效应是指辐射诱发的癌症和遗传效应的概率，而不是严重性随剂量的增加而增加，且没有剂量阈值；非随机效应现称确定效应或组织反应，即具有阈剂量特征的细胞群损伤，效应的严重程度随剂量的增加而增加。提出辐射防护三原则：实践的正当性、防护最优化、个人剂量限值。明确辐射防护的目的在于防止非随机效应，并限制随机效应的发生率，使之达到被认为可以接受的水平。这一系列构想的基础是线性无阈（linear non threshold，LNT）假设，即辐射诱发的随机效应发生概率按正比方式随剂量增加而增加，任何微小剂量的辐射均将增加随机效应的危险性。LNT 假设的流行病学依据是日本原子弹爆炸幸存者癌症危险的剂量-效应关系，其理论基础是靶学说，即电离辐射穿过细胞，能量沉积在该细胞的核中，引起 DNA 靶损伤，产生生物效应。新近微束照射和微剂量学的研究表明，小剂量、低剂量率照射情况下 DNA 的损伤是由独立的辐射径迹引起的，细胞突变的概率与穿过细胞核的径迹数（剂量）成正比，支持靶学说和 LNT 假设。

但近来的研究发现，辐射还可以引起非靶效应，如辐射的旁效应（受照细胞产生的信号或分泌的物质，使未受照的临近细胞产生类似的辐射效应）、基因组不稳定性（效应未发生在受照细胞中而是发生在其子代细胞中，在照后的许多代细胞仍然存在基因组损伤和其细胞学后果）。这两种效应通过增加受作用细胞的数目放大辐射生物效应。研究还发现低剂量辐射有兴奋性效应（低水平电离辐射对生物体或其组成部分的刺激作用，这种作用可能是有益的）和诱导适应性反应（低剂量照射可减轻随后大剂量照射所致的损伤），能减弱辐射的生物效应。上述效应可能改变低剂量照射剂量-效应的线性关系，对 LNT 假设提出挑战。

新近的研究还发现，在分子、细胞和组织/器官水平存在修复损伤、清除损伤细胞和抑制肿瘤形成的生物学机制，并证明这些机制可被低剂量辐射激活。癌症的发生和发展并非单个细胞变化的后果，它取决于组织内的细胞间反应，并受制于机体内的防御适应机制 。这些发现也与 LNT 假设相悖。

另外，辐射高本底地区人群流行病学调查，如中国阳江辐射高本底地区人群

健康调查，未发现数倍于对照地区的辐射水平的照射引发癌症几率增高。大量的放射流行病学研究也未见到慢性淋巴细胞白血病、睾丸癌和黑色素瘤、皮肤癌等发病率与照射相关的有统计学意义的增加；皮肤癌以及某些 α 发射体诱发的癌症可能具有实际阈值。

作为现今辐射防护体系理论基础的 LNT 假设的正确性在放射生物学和辐射防护学界引发了广泛的争议，其核心是：①辐射生物效应的剂量-效应关系是否呈线性，特别是在低剂量部分；②是否有剂量阈值，如有其阈值是多少；③辐射致癌的单细胞起源多阶段、多机制发生理论的可靠性。对此一些学术团体和国际机构的观点也不一致。联合国原子辐射效应科学委员会（UNSCEAR）2000 年报告、美国辐射防护与测量委员会（NCRP）2001 年 136 号报告、美国电离辐射生物效应委员会（BEIR）Ⅶ 2006 年报告均重申支持 LNT 假设。法国科学院 2005 年报告认为辐射致癌危险有实际阈值，LNT 假设不符合实际。ICRP 103 号出版物 2007 年新建议书仍将 LNT 假设作为辐射防护体系的基础，但承认 LNT 假设是一个审慎的判断，该判断存在不确定性，明确支持 LNT 假设的生物学和流行病学资料尚待获得。

证明 LNT 假设的正确性是一个重大科学难题。虽然放射流行病学调查能提供人类辐射效应最直接的证据，但由于低于 100 mGy 时基线危险的统计学变化，以及小而不可控制的偏倚会使辐射致癌危险变得不确定，流行病学方法不具有直接揭示在低剂量范围内癌症危险的效力。将流行病学与细胞和分子生物学基础研究相结合的分子流行病学，可望产生较大成效，但这类研究刚刚起步。

从基础生物学方面证实 LNT 假设的正确性也存在诸多难点：

(1) 细胞具有 DNA 的损伤修复和通过凋亡排除损伤细胞的机制。辐射诱发的 DNA 损伤有很大比例是复杂的集簇损伤，其修复较为困难。虽然实验表明 DNA 修复和细胞凋亡因辐射剂量和剂量率而不同，但还不清楚在多大剂量下辐射诱发的损伤能够精确修复和彻底排除。

(2) 旁效应、基因组不稳定性、适应性反应和兴奋性效应能影响小剂量、低剂量率情况下的剂量-效应关系，但其分子机制及剂量依赖性和它们跟其他生物效应（如癌症）发生的关系还不明了。

(3) 辐射致癌的机制尚不清楚，如原癌基因和抑癌基因的作用和剂量依赖性；单个细胞内积累的病变是否足以导致癌症发生；抑制肿瘤形成的免疫防御功能在低剂量照射情况下被激活的机制及其剂量依赖性；组织调控和免疫监视异常在癌症发生中的作用；基因与基因、基因与环境交互作用在辐射致癌的遗传易感性中的意义等。

解决 LNT 假设正确性的途径可能要靠基础生物学原理来推导。进一步开发基因组学、蛋白质组学、代谢组学、转录组学、信号组学、三维培养等技术在低

剂量辐射效应研究中的应用；用尽可能低的剂量和剂量率，从基因、细胞、组织器官、整体和群体水平上进行研究，深入地探讨低水平辐射放射生物学机制；重视不同剂量下细胞间相互作用及其微环境在放射生物效应（特别是致癌效应）发生中的意义，将有助于对低水平辐照的健康效应进行较好的理解和评估，对LNT假设的正确性做出判断。

关于LNT假设正确性的争论，促进了放射生物学和辐射防护学基础理论的研究，深化了对低剂量放射生物效应机制的认识，对正确评价LNT假设，改善现今的辐射防护体系具有重大的意义。

参考文献

国际放射防护委员会.1983. 国际放射防护委员会建议书. 李树德译. 国际放射防护委员会第26号出版物. 北京:原子能出版社

联合国原子辐射效应科学委员会.2002. 电离辐射源与效应. 冷瑞平等译. 联合国原子辐射效应科学委员会2000年报告,卷Ⅱ:效应. 太原:山西科学技术出版社

魏履新.1998. 阳江高天然放射性本底地区流行病学研究近况. 中华放射医学与防护,18(5):289～294

夏寿萱.1998. 放射生物学. 北京:军事医学科学出版社,46～64

ICRP. 2005. Low-dose extrapolation of radiation-related cancer risk. ICRP Publication 99. Ann ICRP,35 (4)

ICRP. 2007. The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 103. Annals of the ICRP

NAS/NRC. 2006. Health risks from exposure to low levels of ionizing radiation. BEIR Ⅶ-Phase 2. Board on Radiation Effects Research Division on Earth and Life Studies, National Research Council of the National Academies. Washington: National Academies Press

NCRP. 2001. Evaluation of the linear-non-threshold dose-response model for ionizing radiation. NCRP Report No. 136. National Council on Radiation Protection and Measurements, Bethesda, MD, USA

Preston DL, Ron E, Tokuoka S, et al. 2007. Solid cancer incidence in atomic bomb survivors: 1958～1998. Radiat Res, 168:1～64

撰稿人：王继先
中国医学科学院放射医学研究所

医疗照射的正当化和辐射防护最优化

Justification of Medical Radiation and Optimization of Radiological Protection

1. 背景

医疗照射指患者因自身医学诊断或治疗所受到的辐射照射、照顾和安慰患者的人员所受的辐射照射，以及生物医学研究计划中志愿者所受到的辐射照射。医疗照射给人类带来巨大的诊断和治疗利益，但确实也存在不小的潜在危害。当一项医疗照射的潜在危害大于所获得的利益时就是不正当的；即使某些医疗照射是正当的，也应尽可能减少潜在危害，这是医疗照射防护最优化应解决的问题。寻求建立起判断医疗照射是否正当和如何合理开展医疗照射的科学模型是目前国际原子能机构（IAEA）和世界卫生组织（WHO）最关心的热点科学难题之一。

2. 科学意义

由于有的医疗照射未进行正当性判断，已有造成严重辐射损伤事故的实例。例如，进行腋嗅放射治疗就是典型的不正当医疗照射行为，这种治疗在我国就发生过 20 多人严重辐射损伤的事故。不合理地使用医疗照射（未最优化）也有可能引起严重辐射损伤，例如，美国 FDA 对介入操作 14 例患者严重辐射皮肤损伤进行过报道，图 1 是介入操作中引起的不同皮肤损伤的典型例子。另一方面，医疗照射的潜在危害还有可能引起肿瘤和遗传疾病的增加，例如按我国目前医疗照射年集体剂量 5 亿人 · mSv 计算，意味着每年有可能引起这类疾病增加 2.5 万人，这将严重危及我国居民的人口素质。又如，我国在一段时间内曾用 X 线透视检查生育期妇女的怀孕状况，对怀孕妇女的照射有可能引起胎儿的遗传损伤，这是明显的不正当的医疗照射。医疗照射新技术的使用，加剧了这些潜在的辐射危害。以血管造影为例，一次血管造影的有效剂量为 6mSv，在这种剂量水平下 3300 例中可能会有 1 例严重癌发生。若我国的血管造影检查每年为 330 000 人次，由此每年潜在严重癌发生的例数将多达 100 人。

在实际工作中，目前还没有一个合理可用的医疗照射是否该进行和如何合理开展的科学模型和方法，因而辐射事故频发，潜在危害未得到控制。这是一个亟待解决的困难问题。

另一方面，在可以开展的医疗照射中，还应采取一些措施来实现利益最大化，这就是医疗照射辐射防护的最优化。利益最大化的基本原则是：在能取得基







图1　放射介入操作中不同情况下的皮肤损伤

图为高剂量冠状动脉血管成型术引起的辐射损伤，照后2个月（A）、照后4～5个月（B）、照后18～21个月（C）。资料来源：IAEA 安全报告 No：59

本的医疗照射利益的前提下，考虑了经济和社会因素后，遭受照射的人员数量及患者剂量大小，均应保持在可合理达到的尽可能低的水平。应当注意的是，防护的优化并非剂量的最小化，最佳的选择未必是剂量最低的选择。对诊断情况，应尽可能做到在取得相同诊断信息的情况下，患者接受剂量的水平应尽可能低。当然，这里的尽可能，是指只要社会和经济条件容许。在治疗情况下，应尽可能做到在取得相同治疗效果的情况下，患者接受剂量的水平应尽可能低，特别是要降低正常组织受到的辐射照射。要真正减轻医疗照射的全民剂量负担，降低由此引起的肿瘤和遗传危害，关键的问题是做好辐射防护的最优化。如何使医疗照射真正达到最优化，也是一个非常困难的问题。这里不但有科学技术层面的问题，也有法律意识、责任感、伦理等诸多问题。

3. 最新进展

尽管要准确进行医疗照射正当性判断是一个目前尚未解决的科学难题，但为了保护患者和职业人员的健康，国际（IAEA 和 WHO）和我国已制定了一些标准和规范。例如明确规定已有相关医疗照射信息，未共享该信息而进行的重复性诊断性照射；没有或治疗计划系统不完善的治疗性照射；怀孕妇女的腹部和骨盆区的照射；将透环和儿童体检作为常规检查项目和健康儿童作为生物或医学研究的自愿者等是不正当的医疗照射，严格禁止开展。也要求对以下情况进行现场适时的正当性判断：新方法和新技术使用前；已判断为正当的诊疗类型，但应用范围扩大；阳性检出率不高的群体检查和医学筛选检查（例如，乳腺癌的群体性检查）、按病例对特殊人群（哺乳和怀孕妇女、生育年龄妇女、儿童等）等。这些正当性判断由于缺乏科学的可行的模式，虽有要求，实际上是无法操作的。为弥补这一问题，提出了一些建议。例如，确保有资质的处方医生才能出具医疗照射

处方，并保证医疗照射实践与处方的一致性；处方必须利用已有信息，避免不必要的重复照射；在可能接受大剂量（CT、介入）或风险可能很高（小儿、孕妇检查）的诊断检测中，处方医生应考虑使用非辐射的替代技术（例如超声、磁共振成像和内镜检查）的可能；应考虑群体检查查出疾病的有效治疗可能性，以及这些疾病得到控制而使公众所获得的利益；应考虑医疗照射的有关指导水平的警示作用；放射治疗中应注意治疗计划系统的完善，肿瘤周围正常组织辐射损伤及其并发症等。

为了实施医疗照射最优化，国际和国家也出台了技术标准和规范，但在保证这些标准和规范实施方面目前遇到了很大的困难。困难主要来自三个方面：一是绝大多数患者还不知道医疗照射存在潜在危害，更不懂得如何保护自己；二是绝大多数与医疗照射相关的医院法人、执业医生和技师，对医疗照射防护最优化没有责任感和法律意识，也不知道国家已制定了防护最优化的强制性国家技术标准，更不懂得怎么去实现医疗照射的利益最大化；三是国家有关行政管理和监督部门还未对相关标准的实施进行监督检查。解决这些问题的关键在于如何做好科普宣传和加强对相关人员的技术培训。

在解放初期，人们把 X 线透视检查称为“照电火”，医院要给“照电火”，好像是一种荣幸，人们一点也不知道“照电火”会有潜在危害。随着技术的发展，人们开始不以“照电火”为荣了，也逐渐知道多照了不好。随着 CT 等新的诊断技术的出现，有的患者已觉得普通拍片检查太低级，想接受 CT 这种高新技术的诊断，普通患者还不知道 CT 比普通拍片的潜在危害高几百倍，甚至上千倍。实际上一些诊断检查中普通拍片已能得到足够的诊断信息，没有必要冒着高1000 倍的风险去照 CT。从这些例子就可以看出，要减少不必要的照射，降低医疗照射的潜在危害，实现最优化，对普通民众普及相关知识的教育，提升他们的科技水平及维权意识是极其重要的。要做到这一点，不但应加强这方面的科普知识宣传，还应当在中小学的课程中适当加进这方面的教学内容。

不但存在技术难题，还存在另一方面的问题。例如，一些医院不是从减少患者不必要的照射，降低潜在危害为其出发点，而是从经济效益最大化为出发；本来只需做普通拍片检查的，也要开出进行 CT 检查的处方；应当在固定 X 线机房检查的，却要进行床旁检查；不管患者是否有相关影像诊断信息，而继续开出进行医疗照射的处方；尽管某一疾病用医疗照射检查的阳性率很低或治愈的可能性极小，为了经济利益而开展群体检查；在介入操作中，不注意对患者的防护而引起严重的皮肤损伤；在放射治疗中，没有使用完善的治疗计划系统，在开具放射治疗处方时根本不考虑适应证和并发症；在核医学诊断检查中，很少考虑阻断放射性药物进入正常器官等问题。解决问题的根本方法是要制定相应的措施，使医院从这些非优化的医疗照射中得不到经济利益。

4. 主要难点

在建立正当化判断的科学模型中，怎么进行利弊权衡是一个十分复杂和困难的大问题。它不但有医疗照射和辐射防护本身的科学技术难题，更难的是怎样把社会的、部门的、个人的、经济的、伦理的和科学技术的诸多影响因素都加以考虑，并在同一个尺度上去进行利弊权衡。要建立起这样的多因素、影响的权数又十分不明确的判断模型，目前还只能是努力的方向。

从科学技术层面上讲，要做到利益最大化也是不容易的事，除了类似正当性判断中难以进行社会资源消耗与获得的降低患者剂量所得利益之间的权衡问题，还存在如何做才能使利益最大化的问题。使利益最大化（即最优化）是一个相当复杂的工程，受操作技术、程序、设备、环境、质量保证等诸多因素的影响，难以用一种简单的方法来描述。例如，如何建立起以下诸多方面的辐射防护最优化方法，也有一定的难度：对放射诊断操作中为患者辐射敏感器官提供科学实用的屏蔽措施，建立科学规范的放射学诊断操作规程及其运行参数，控制使用可携式或移动式放射设备并应采取严格有效的防护措施，尽量避免使用没有影像增强器的设备直接荧光透视检查等最优化措施；在核医学诊断操作中应尽可能避免使用长半衰期的放射性核素，根据患者的特点科学规范使用放射性药物及其用量，研制阻断非检查器官对放射性药物的吸收方法等最优化措施；建立规范科学的放射治疗操作规范等最优化措施。

5. 展望

目前国际和国内都认识到医疗照射的正当化和辐射防护最优化既是一个亟待解决的科学问题，又是一个解决起来极其困难的问题。正因为如此，这方面是IAEA 与各国的科研技术合作的重点支持领域，也是我国科学研究比较活跃的领域。应当说，这方面的问题会逐步得到解决，但由于难度太大，在 10 年之内要彻底解决这一问题是不现实的。

虽然整个问题难以在短期内得到解决，但我们可以从一些基本的事情做起。应当说，目前我国医疗照射最优化与国际上还有较大差距，问题在大多数医院法人、执业医生、核医学专家、物理学家和技师等相关人员，不知道国家为确保医疗照射起码的正当性判断和最优化制定的法规和标准，因此不明白他们肩负着医疗照射正当化和辐射防护最优化的责任，更不懂得怎么去做。为此，首先应对相关人员开展技术培训，只有通过培训合格的才能开展医疗照射的诊疗工作，对已取得资质的执业者还应当接受继续教育和培训。为提升相关医务人员的技术水平，建议在大学的相关专业中，设置医疗照射正当性和最优化的教学内容。另一方面，为实现辐射防护最优化，各医疗单位应按国家相关法规和标准的要求，制定医疗照射质量保证大纲，并制定出相关设备的验收、状态及稳定性检验的项目、指标及检验周期，并按规范的方法进行检验；对患者的剂量及施用的放射性

活度进行估算；建立监测仪器校准、工作条件验证、规范化操作、患者特征标识/验证/记录、结果评价、定期和独立的审查等规范性程序；在施用任何放射性药物前，应分辨和测定其活度；应对实施医疗照射用源、放射治疗计划系统、设备和附属物制定出质量保证程序等。

参考文献

IAEA. 2005. 电离辐射医疗照射的辐射防护 .安全标准丛书 No. RS-G-1. 5

IAEA ,ILO ,IOMP ,ISR ,PAHO ,WHO. 2006. Applying radiation safety standards in diagnostic radiology and interventional procedures using X rays. IAEA Safety Report Series No. 39. IAEA , Vienna

IAEA. 2010. Patient dose optimization in fluoroscopically guided interventional procedures . IAEA-TEC-DOC-1641

ICRP. 2007. Radiological protection in medicine ,Ann. ICRP 37(6)

ICRP. 2007. The 2007 Recommendations of the international commission on radiological protection ,Ann. ICRP 37(2～4)

Vlietstra RE ,Wagner LK ,Koenig T ,et al. 2004. Radiation burns as a severe complication of fluoroscopically guided cardiological interventions. J Interven Cardiol ,17 :131～142

Wong L ,Rehm J. 2004. Images in clinical medicine :radiation injury from a fluoroscopic procedure. N Engl J Med ,350(25):23

撰稿人：张良安

中国医学科学院放射医学研究所

低水平辐射兴奋效应

Low Level Radiation Hormesis

1. 背景

自从伦琴（Röentgen）发现X射线（1895年）以来，人们逐渐认识了存在于宇宙和人类生存自然环境中的电离辐射现象，这种核物理学现象伴随着整个人类的进化史。20纪40年代后，随着核能的发展和核技术的日渐广泛应用，人们在生产、生活和科学研究活动中与电离辐射接触的机会日益增多。这些人类活动都涉及电离辐射对人体的作用。电离辐射可对人或生物机体的器官、组织、细胞和分子发生影响，在瞬间出现物理、物理化学和化学变化，并在随后的继发反应中使机体产生不同程度的生物效应，其表现因辐射剂量、剂量率、作用方式及机体状态等的不同而异。那么，机体受到电离辐射作用后，一定会产生有害的效应吗？或者说，是否存在“阈剂量”？20世纪80年代初期，美国学者Luckey在总结以往研究资料的基础上，提出了辐射兴奋效应（radiation hormesis）的观点，认定电离辐射对机体的损害存在“阈剂量”，与那些持有电离辐射“无阈”假说学者的观点截然不同，并进行了有力的挑战。这是目前从事放射生物学领域的研究者期待和解决的重要课题。

2. 科学意义

“hormesis”一词源于希腊语hormaein，意指兴奋（to excite），其含义是任何一种物质（因子）在低剂量时引起任一系统的刺激作用。低水平辐射（low level radiation）系指低剂量、低剂量率的电离辐射，剂量在0.2 Gy以内的低传能线密度（linear energy transfer，LET）辐射或0.05 Gy以内的高LET辐射被认为是低剂量辐射；若同时剂量率在0.05 Gy/min以内，则称为低水平辐射。持有辐射兴奋效应观点的学者认为，低水平辐射对生物体或其组织部分产生的兴奋效应，可能对机体有益；可发生于生物进化的不同阶段，表现于许多基本生命活动，是一种普遍存在的生物学现象。例如，低剂量辐射促进生长、繁殖，延长寿命，提高适应能力，增强防卫、修复功能等。但对不同种系生物引起兴奋效应的剂量范围不同，一般低等动物可耐受较大剂量照射。近些年来，通过流行病学调查和大量的实验证实，低剂量辐射可引起机体的兴奋效应。其研究结果有力地支持了低水平辐射兴奋效应的假说，可为辐射防护及其法规制定提供重要的实验依据，并为放射生物学提供重要的理论基础，对电离辐射生物效应有了更加本质的认识。

3. 主要难点

放射生物学研究的核心问题之一是辐射剂量与生物效应的关系，中高剂量辐

射对健康有害，是公认的事实。但低水平辐射对健康的影响，目前尚存不同的看法，涉及的要点是辐射致癌是否存在阈值，这是放射生物学领域当前研究的热点，也是问题的难点。“无阈”假说者认为，任何微小剂量的辐射均将增加致癌的危险，其基础是由高、中剂量辐射致癌的剂量效应关系外推，而无直接的放射生物学或辐射流行病学依据。这种观点一直作为辐射防护的指导原则，制定有关防护法规的依据。但另一派学者持有相反的看法，即低水平辐射可引起兴奋效应。因此，确认电离辐射生物效应是否存在阈剂量，探讨低水平辐射生物效应的本质及其诱导适应性反应机制，以及对癌症发生的影响等问题是解决这一难点的核心。到目前为止，对这一难题已做了大量的研究，并且在深入开展。

4. 最新进展

低剂量辐射可诱导适应性反应。人类生活在一个低水平辐射的环境中，时时刻刻受到天然本底辐射和非天然辐射的作用，对机体正常生育、繁殖、生长和防卫功能产生有益或无害的影响。大量的实验证实，低剂量辐射可诱导适应性反应；也就是说，机体或细胞受到低剂量辐射的预先作用，可减轻继后较大剂量照射的损伤作用。但是，这种适应性反应是在一定的剂量（即一定的低剂量和较大剂量）及间隔时间的条件下获得的。适应性反应的表现形式多种多样，在整体、细胞、亚细胞和分子水平均有其表现，而且不同层次的适应又互相关联。研究者最初观察的终点指标为染色体畸变，称为细胞遗传学适应性反应，以后观察指标逐渐扩展到 DNA 链断裂、突变、免疫功能和致癌频率等。有关低剂量辐射诱导适应性反应的发生机制，认为低剂量辐射通过 DNA 损伤或其他途径，活化细胞信号传递通路，调节蛋白质分子，启动细胞适应性反应，伴有机体各系统调节和细胞间反应的参与等。

低剂量辐射可增强免疫功能。通过大量的研究，低剂量辐射可引起机体免疫反应的增强，使抗体产生增高，对肿瘤细胞的杀伤活性增强，刺激某些细胞因子分泌增多。低剂量辐射通过提升抗原提呈细胞（antigen presenting cell，APC）和 T 细胞表面分子表达和细胞因子分泌，加强免疫细胞间的相互作用，增强对 T 细胞的共刺激效应，促进 APC 和 T 细胞在照射后业已启动的信号转导进一步活化；同时，神经和内分泌系统功能发生相应的改变，导致免疫功能的增强。

低水平辐射不增加癌症发生的危险。从人群调查到动物实验获得的资料证实，低水平辐射在一定剂量范围内不一定引起癌症危险的增加。除了要考虑特殊情况下放射敏感性的差异外，从总体上讲，0.1 ～ 0.2 Gy 以内剂量照射不显著增加人类癌症发生的危险。这也从一个侧面说明，由高剂量率和大剂量辐射引起的损伤效应而推导的辐射致癌“无阈”假说尚未得到低水平辐射整体实验和人群观察的直接证据。另一方面，在许多群体中见到低水平辐射致癌相对危险显著降低，说明其致癌作用中存在适应和兴奋效应的可能性。1979 ～ 1998 年对广东阳江天然辐射高本底

地区 190 万人 · 年的研究获得了重要的结论，不支持“无阈”假说，即该地区癌症死亡相对危险与对照地区相比无显著性差异，也未发现有辐射相关的部位别癌症死亡的增加。根据对此高本底地区居民癌症研究结果与细胞遗传学和免疫学研究结果的综合分析认为，不能排除存在真正阈值的可能性。因此，不能由高剂量致癌效应的模型无条件地外推以估计低剂量诱发癌症的危险，因为在很低剂量条件下可能不增加致癌的危险。进一步研究发现，75mGy X 射线全身照射荷瘤小鼠，可作为一种优化手段，有效增强 pEgr-IL18-B7.1 基因放疗的抑瘤效果。

从上述现有的研究结果来看，低水平辐射存在兴奋效应，可诱导适应性反应，增强免疫功能，不增加癌症的危险。这些研究结果有悖于“无阈”假说，但还需大量深入的探究，以获得足够证据，确立低水平辐射兴奋效应及电离辐射“阈剂量”的存在。

5. 值得注意的问题

值得一提的是，我国目前经济建设正处于飞速发展时期，正在增建核电站，以满足与日俱增的能源需求和短缺。实际上，核电生产过程中向环境释放的辐射量很低，远远低于医疗辐射的贡献；同时，所造成的环境污染又相对小。因此，从低水平辐射兴奋效应角度来看，建设核电站不会增加对人群健康的危害。其实，电离辐射无处不有、无处不在，并非对人体健康绝对有害，在某种条件下低剂量辐射可能对健康有益。

参考文献

龚守良，吕喆，刘淑春，等. 2003. 低剂量辐射诱导胸腺细胞凋亡的适应性反应. 中华放射医学与防护杂志，23：413～415

龚守良. 2009. 电离辐射生殖遗传效应. 北京：原子能出版社

刘树铮. 1996. 低水平辐射兴奋效应. 北京：科学出版社

刘树铮. 2006. 医学放射生物学. 第 3 版. 北京：原子能出版社

刘树铮. 2008. 低剂量辐射致癌效应的阈值问题. 辐射防护，28(6)：349～361

陶祖范，孙全富，邹剑明，等. 2008. 高本地辐射与癌症研究——中国阳江高本底地区研究实践. 北京：原子能出版社

Liu Shuzheng. 2003. On radiation hormesis expressed in the immune system. Crit Rev Toxicol，33(3&4)：431～441

Luckey TD. 1980. Hormesis with Ionizing Radiation. Boca Raton：CRC Press

Olivieri G，Bodycote J，Wolff S. 1984. Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. Science，223：594～597

撰稿人：龚守良
吉林大学

维生素缺乏症的发生机制

Mechanisms of Vitamin Deficiency Diseases

维生素缺乏是世界范围普遍存在的公共卫生和营养问题之一。虽然人们对许多维生素缺乏症早已有所认识并进行了大量的相关研究，但其发生机制至今大多尚未完全阐明。

人们对维生素缺乏病的了解，起源于数百年前在长期航海的水手等特殊人群中常发生的坏血病（维生素 C 缺乏病）。1740 年，英国航海外科医生 Lind J 发现食用柑橘可治愈水手的坏血病，这被认为是对维生素缺乏的最早认识。但以 1912 年真正发现第一种维生素——维生素 B_1（硫胺素）算起，维生素的发现、对人体的生理作用和缺乏症的确定至今不过百年历史。

在一系列维生素被发现后，学术界对其生理作用和缺乏症的发生机制已进行了大量的研究。目前已基本阐明大多数维生素在人体内的生理功能，对某些维生素缺乏症的发生机制也有所了解或已有初步认识。如维生素 A（视黄醇）维持正常视力（尤其是暗适应能力）的生理作用是由于在视网膜上的 11 -顺式视黄醛能与视蛋白结合生成视紫红质，当其被光照后，11-顺式视黄醛转变为全反式视黄醛，同时释放出视蛋白，引发神经冲动而产生视觉。另外，维生素 A 在维持上皮和黏膜的正常结构与功能方面也有重要作用。因此，维生素 A 缺乏可导致夜盲症和干眼病的发生。又如，维生素 D 的主要生理功能是促进钙吸收和调节钙代谢，故其缺乏可引起佝偻病和骨质疏松、骨质软化等；维生素 K 缺乏引起的凝血障碍是由于其作为辅因子参与 γ-羧基谷氨酸的合成，故可影响维生素依赖性凝血蛋白的活性；维生素 C 缺乏引起的坏血病与其在胶原蛋白合成过程中的作用有关；叶酸缺乏引起的巨幼红细胞贫血与其在一碳单位代谢中的作用和对核苷酸合成的影响有关等。

另一方面，尽管大多数维生素在人体内的生理作用已基本阐明，且相关的实验研究技术已得到飞速发展，但一些典型的维生素缺乏症的发生机制至今仍有许多问题未完全阐明。如维生素 B_1（硫胺素）、维生素 B_2（核黄素）和尼克酸（烟酸）在人体内的主要生理作用都是作为辅酶参与各种生化反应，尤其是与能量代谢有关的反应，但其各自所致的典型缺乏症（维生素 B_1 缺乏致脚气病、维生素 B_2 缺乏致口舌炎、尼克酸缺乏致癞皮病等）表现却大不相同，其发生机制至今尚未得到合理的解释。再如维生素 C 缺乏所致的坏血病，虽已知道其发生与胶

原蛋白合成有一定关系，但仍不能完全阐明维生素 C 缺乏究竟是通过哪些途径和机制导致坏血病发生，也不能完全解释坏血病的主要临床表现与维生素 C 缺乏之间的直接关系。维生素 B_{12} 缺乏导致的中枢神经系统脱髓鞘损伤机制尚未阐明，且不能解释为何维生素 B_{12} 缺乏的动物模型并不出现脊髓病变；而维生素 E 则恰恰相反，其缺乏在大鼠等动物可导致雄性生殖功能障碍，而在人体尚无此类缺乏症状的确切证据。这种差异是否与其在动物和人体内的抗氧化作用机制不同有关也未得到阐明。

造成维生素缺乏病的发生机制难以完全阐明的原因主要有以下几方面：

（1）维生素缺乏的临床表现常不具有特异性，即这些症状和体征也可能与其他疾病的表现类似。如维生素 B_2 缺乏导致的虚弱、疲劳、口痛、眼烧灼、发痒、口角炎、皮炎、贫血等症状都可见于其他许多疾病，以至于除了使用“治疗性诊断”（即补充较大剂量的相应维生素一段时间后观察症状/体征是否有明显的好转）和体内维生素 B_2 负荷的实验室检查外，至今还没有更好的鉴别诊断方法。因此，发现和肯定某种维生素缺乏症，最初面临的主要问题是如何从膳食的综合作用和其他复杂的致病因素中辨别出该维生素的特殊作用。随着维生素生理功能的逐步阐明、缺乏病动物模型的建立、“治疗性诊断”手段的应用以及食品分析和维生素测定技术与仪器设备的发展，这方面的问题在一定程度已得到解决。

（2）某种维生素的缺乏常伴随其他多种维生素或营养素缺乏，出现多种维生素/营养素缺乏的综合表现。如维生素 B_2 缺乏常与其他水溶性维生素（维生素 B_1、维生素 B_6、维生素 B_{12}、叶酸等）缺乏同时发生；维生素 B_{12} 缺乏易继发叶酸缺乏；维生素 D 缺乏往往表现为钙缺乏的症状和体征；蛋白质-能量缺乏综合征往往也伴随有多种维生素的缺乏等。而且，现已证实多种维生素/营养素的代谢过程是相互关联或影响的，如高脂肪膳食可增加维生素 B_2 的需要量，而高蛋白膳食则有利于维生素 B_2 的利用和储存；维生素 E 在肠道内可保护维生素 A 使其免遭氧化破坏，故能促进维生素 A 在肝内的储存；大鼠缺乏维生素 B_1 时，组织中的维生素 B_2 含量亦下降，同时尿中排出量增高等。

（3）许多维生素，尤其是水溶性维生素在体内大多以辅酶的形式存在并发挥其生理作用。如维生素 B_1 被磷酸化后生成焦磷酸硫胺素（thiamine pyrophosphate，TPP）和二磷酸硫胺素（thiamine diphosphate，TDP）而作为多种脱羧酶的辅酶；维生素 B_2 与核苷酸结合，生成黄素单核苷酸（flavin mononucleotide，FMN）和黄素腺嘌呤二核苷酸（flavin adenine dinucleotide，FAD）而参与体内许多氧化还原酶反应和电子传递过程；尼克酸则以尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸（nicotinamide adenine dinucleotide，NAD，即辅酶Ⅰ）和尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（nicotinamide adenine dinucleotide phosphate，NADP，即辅酶Ⅱ）形式参与多种生物氧化还原反应的电子传递过程；磷酸吡哆醛（pyridoxal phos-

phate，PLP）是 100 多种特异性酶反应中的辅酶，尤其与氨基酸代谢、糖原代谢、磷脂生物合成以及生酮/生糖反应的一些关键酶活性有关；叶酸在核苷酸、氨基酸和其他重要细胞组分的合成、互变和修饰的过程中起到接收和转运一碳单位的作用；维生素 B_{12} 作为 *L*-甲基丙二酸单酰辅酶 A 变位酶和蛋氨酸合酶的辅酶，在蛋氨酸合成和其他甲基转移反应中发挥作用等。由于酶反应的复杂性，许多酶常具有不止一个调节成分，可形成不同活性形式或非活性形式的各种酶复合物，而且许多酶反应往往还要受多种形式的神经-体液调节和底物/产物反馈调节。由于多种调节机制和辅助因子的存在，造成在研究和阐明某种维生素缺乏所致酶活性的改变与缺乏症发生及其临床表现之间关系的方面，常常会遇到很多困难。

因此，对于维生素缺乏症发生机制的全面阐明还有待于更深入、细致的研究。目前此领域的研究热点主要集中在对经典维生素缺乏症的发生机制研究，以及维生素缺乏与其他疾病的相关性研究两个方面。

在对经典维生素缺乏症的发生机制研究方面，近年来已取得了一些新的进展。如对维生素 B_1 缺乏引起的脑和神经系统病理学改变及其生化过程，已在体外和动物实验中进行了一些较深入的研究。这些研究结果不仅对于阐明维生素 B_1 缺乏所致脚气病的发生机制有很大意义，而且对认识人类神经系统其他疾病（如 Wernicke-Korsakoff 综合征、阿尔茨海默病和帕金森病等）也有很大帮助。在对维生素 B_2、尼克酸、维生素 D 和抗坏血酸缺乏症等的发生机制研究方面目前也有一些进展，如已阐明维生素 B_2 以 FMN 和 FAD 形式作为谷胱甘肽还原酶的辅酶，为该酶的正常活性所必需，故对于维持体内正常的抗氧化活性有重要作用。维生素 B_2 缺乏时体内的脂质过氧化反应增强，可部分解释这种维生素缺乏时的某些表现。维生素 D 已被证明是钙内稳态和骨代谢最重要的调节因子之一，1，25-（OH）$_2$$D_3$ 与其他类固醇激素一样，可通过基因转录方式快速激活多种信号转导途径而产生相应的生物学效应，而维生素 D 受体（vitamin D receptor，VDR）则是介导 1，25-（OH）$_2$$D_3$ 发挥其生物学效应的核内大分子。人类 VDR 基因定位于第 12 号染色体上，由 14 个外显子和数个内含子组成，总长度约 75kb。VDR 基因多态性与佝偻病遗传易感性之间的关系以及在骨代谢和其他相关疾病发生发展中的作用也越来越受到关注。近年来的研究表明，VDR 基因型与骨密度、骨量丢失和肠道钙吸收等都可能有很大关系，值得做更深入的研究。此外，cDNA 微阵列研究结果已表明，补充维生素 C 可诱导许多相关基因的活性上调，包括 α-2-1 型前胶原蛋白基因、载脂蛋白 E 基因、转铁蛋白基因和 IFN-α 可诱导蛋白基因等，提示这可能是维生素 C 缺乏所致坏血病和贫血、免疫力降低等临床表现的重要机制之一。但这方面的研究还有待更多更深入的工作。

在维生素缺乏与其他疾病的相关性研究方面也已有一些新的发现。例如，已

证实叶酸缺乏除可导致胎儿神经管发育畸形外，还与胎儿生长迟缓、早产和低出生体重等其他不良妊娠结局有关；孕妇叶酸缺乏和高同型半胱氨酸血症是胎盘血管疾病和不良妊娠结局的中度危险因素，但其具体机制还需进一步阐明。血液同型半胱氨酸与许多心脑血管疾病的关系及维生素 B_6、维生素 B_{12} 和叶酸的保护作用近来也越来越受到重视，这些维生素可作为含硫氨基酸代谢所必需的辅酶发挥作用，但其具体的作用机制尚未完全阐明。近年的研究表明，维生素 A 缺乏与男性不育有关，其机制之一可能是维生素 A 所介导的信号转导与生殖细胞骨形态蛋白-4（bone morphogenetic protein-4，BMP-4）的交互作用。尼克酸以辅酶 NAD/NADP 形式除参与经典的氧化还原反应外，还是许多重要的生理活动所必需的。如与静息信号调节器酶的活性、转录调节中脱乙酰基酶的活性、基因组稳定性、神经保护作用等有关，故尼克酸的营养状况可影响年龄相关退化性疾病（如肿瘤、痴呆和糖尿病等）的发展。对维生素 E 的研究热点：一是研究其抗氧化、清除自由基作用及其对基因组稳定性和 DNA 损伤修复、对血脂水平及与细胞氧化损伤有关的疾病发生的影响。已发现维生素 E 可通过抑制自由基形成、活化核酸内切酶、增加受损 DNA 的清除率而减轻自由基诱导的染色体损伤，增加基因组的稳定性。并发现肝内维生素 E 与胆固醇的转运和代谢密切相关，如维生素 E 可调节肝细胞膜上的清道夫受体 BⅠ（SR-BⅠ）的表达，从而影响肝细胞对胆固醇的选择性摄入；对血中高密度脂蛋白（HDL）介导的胆固醇逆转运有明显影响，故补充维生素 E 对于预防与细胞氧化损伤有关的许多疾病，如高脂血症和动脉粥样硬化、阿尔茨海默病、衰老和肿瘤等可能有良好的作用，但其作用机制还有待更深入的研究。二是有关维生素 E 在调节基因/蛋白表达方面的作用及作为酶抑制剂方面的作用研究。已发现维生素 E 清除活性氧基团（reactive oxygen species，ROS）的作用不仅可来源于其抗氧化活性，而且还可通过不依赖其抗氧化活性的其他机制而达到，如抑制产生 ROS 的酶的表达及活性等。在确定是否有需要维生素 E 的特异性代谢通路研究方面，目前也已发现了一些受 α-生育酚浓度影响的信号通路和特异基因，并发现维生素 E 的这些作用可因很多体内微环境的变化（如维生素 E 的浓度、氧化剂/抗氧化剂的种类与浓度等）而有很大不同，其详细的作用机制也还有待阐明。

此外，维生素缺乏不仅可能是由于膳食摄入不足所致，还可由于疾病、药物和内分泌紊乱等而干扰维生素的吸收和利用。这也为特定维生素在体内的代谢动力学过程和缺乏症发生机制研究提供了新的切入点和线索。在今后对维生素缺乏症的发生机制研究中，还需重视对多种维生素/营养素缺乏的综合作用，以及维生素与药物、激素、植物化学物等的交互作用的深入研究。

对维生素缺乏症发生机制的全面阐明，既需要更深入的基础性研究，也需要公共卫生领域的人群应用性研究和流行病学调查，以及临床观察和诊疗等领域的

配合。细胞和分子水平的研究以及人群研究的结果将进一步拓宽我们对维生素缺乏症发生机制的认识。今后还需进一步重视对编码与维生素代谢和转运相关酶和蛋白质的基因研究工作，深入分析基因多态性、营养状况与维生素缺乏症发生发展的相互关系。相信在不远的将来，常见维生素缺乏症的发生机制将得到彻底的阐明，这对于维生素缺乏症的防治和进一步提高国民的健康水平将起到重要的作用。

参 考 文 献

Powers HJ. 2003. Riboflavin (vitamin B_2) and health. Clin Nutr, 77: 1352～1360

Ray LG, Laskin CA. 1999. Folic acid and homocysteine metabolic defects and the risk of placental abruption, pre-eclampsia and spontaneous pregnancy loss: a systematic review. Placenta, 20: 519～529

Rosa M, Baleato R, John Aitken. 2005. Vitamin A regulation of BMP4 expression in the male germ line. Development Biology, 286: 78～90

Scholl TO, Johnson WG. 2000. Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. Am J Clin Nutr, 71(Suppl 5): 1295S～1303S

Stabler SP, Lindenbaum J, Allen RH. 1997. Vitamin B_{12} deficiency in the elderly: current dilemmas. AmJ Clin Nutr, 66: 741～749

Witt W, Kolleck I, Fechner H, et al. 2000. Regulation by vitamin E of the scavenger receptor B_1 in rat liver and HepG2 cells. J Lipid Res, 41: 2009～2016

Yu DH, Lee KH, Lee JY, et al. 2004. Changes of gene expression profiles during neuronal differentiation of central nervous system precursors treated with ascorbic acid. J Neurosci Res, 78: 29～37

Yukiko K, Nakamura, Stanley T Omaye. 2009. Vitamin E-modulated gene expression associated with ROS generation. Journal of Functional Foods, 10: 241～252

撰稿人：张立实　陈锦瑶

四川大学

食物中天然有毒有害成分和毒性污染物对人体危害的风险评估

Risk Assessments of Toxic/Harmful Natural Components/Contaminants in Foods

食物中可能存在多种多样的污染物和天然有毒有害成分。在大多数情况下，这些有害物质通过食物的摄入量往往很少，而时间却可能很长。这种低剂量长期暴露对人体健康的危害程度究竟如何？已成为亟待阐明的重大科学问题。

风险分析（risk analysis）方法已越来越多地应用于食品安全性评价。1991年，FAO（Food and Agriculture Organization，联合国粮农组织）/WHO（World Health Organization，世界卫生组织）建议国际食品法典委员会（Codex Alimentarius Commission，CAC）把风险评估原则应用于食品标准的制定过程。1993年第20届CAC大会提出，食品安全标准的制定应以风险评估为基础。1995年、1997年和1998年，FAO/WHO先后召开了有关风险评估、风险管理和风险交流的专家咨询会议，发布了一系列有关食品安全风险分析基本原理、方法和应用的文件/报告，构建了食品风险分析的基本框架。

食品安全风险分析包括风险评估、风险管理和风险交流三部分。风险评估是风险分析的基础，其目的是判定食品中有害物质对人群健康危害的风险程度。风险评估包括危害识别、危害特征描述、暴露评估和风险特征描述四个步骤，目前各个环节都存在着亟须解决的问题。

就大多数食品污染物和天然有毒有害成分（以下简称食品有害物质）的危害识别和危害特征描述而言，由于人群流行病学资料和临床资料通常难以得到，且根据流行病学调查的结果常难以判断人群的低暴露水平，故目前仍主要以动物毒性试验和体外试验的资料为依据。需要解决的主要问题是如何减少使用高剂量短期暴露的动物/体外试验的结果外推于预测人类低剂量长期暴露可能产生危害的不确定性。

近年来，为解决剂量-反应关系外推的问题，建立相应的生物模型已成为研究的热点。基于生理学的药代动力学模型（physiologically-based pharmacokinetic models，PBPK）和药效动力学模型（physiologically based pharmacodynamic models，PBPD）可定量描述器官/组织内化学物及其代谢物浓度的变化以及靶组织的剂量与毒作用终点之间的关系，并可模拟肝脏等体内代谢转化功能，能反

映接触外源性化学物后从分子水平、细胞水平到器官水平等复杂的生物学变化与效应。而基于生物学的剂量反应关系模型（biologically based dose response models，BBDR）则是结合 PBPK 和 PBPD 二者的综合模型。

目前已有较多的食品有害物质毒性研究报告，但不同的研究由于设计和试验条件等不同，常导致所得出的未观察到有害作用的最大剂量（no observable adverse effect level，NOAEL）可能有较大差异，因此必须对现有的毒性研究资料进行综合分析。目前在此领域已发展了多种模型和定量分析方法。如有序多分类回归模型模拟（属于 Meta 分析），可估计任何特定暴露时间范围内的剂量水平，是评估有害物暴露对健康的潜在危险性较好的方法。此外还有累积概率模型、非限制性概率模型、连续比模型和相邻比模型等。但这些模型大多对数据要求较高，可能产生一定的统计学误差，并可能受到模型拟合者主观性的影响。

食品有害物质的暴露评估主要是根据人体对各种食品的摄入量（由膳食调查获得）和其中有害物质的含量（由食品污染物监测获得）两方面的基础资料，应用一定的模型计算而得到其膳食暴露量。我国从 20 世纪 80 年代起就已开展了食品污染物监测，2000 年正式启动了全国食品污染物监测网，但其覆盖面还有待进一步扩大，其数据分析和管理等还有待加强。而且，由于我国不同地区的膳食模式差别较大，食品有害物质的含量与地域分布和气候等密切相关，导致现有的监测数据尚不够全面，难以支撑准确的暴露评估。此外，食品有害物质的含量还可能由于调查和监测时间、食品加工方式、所用原料及预处理方式等而有较大变化，如食品中真菌毒素的污染水平不仅因季节和地区而异，而且分布极为不均，常集中于小部分样品中；煎炸食品中杂环胺含量可显著增加；热水漂洗可致部分真菌毒素和农药残留量明显降低等，使得污染物监测，特别是采样计划与方法面临很大的挑战。

暴露评估中可能产生的问题：有害物质含量低于一定限值的食品通常未计算在内，以致对人群暴露量的估计低于实际暴露水平；食物有害成分常存在相加效应或协同效应，如单端孢霉烯族毒素的混合污染和多种暴露途径等。只有加强对有害物质在体内代谢的基础研究，提高对“内暴露量”和生物材料中有害物质及其代谢产物的监测水平，才能从根本上解决这些问题。

目前暴露评估的模型主要有三种，即点估计、简单分布法和概率分析。点估计法把食物消费量和其中有害物质的浓度都视为固定值；简单分布法虽应用了食物消费量分布数据，但对于有害物质残留量/浓度却使用一个固定参数值，故这两种方法都不能全面反映人群暴露的分布情况和暴露风险的大小。概率分析法是利用模型中食物摄入量和有害物质在食物中残留量数据的分布资料，并使用描述暴露过程的数学模型中每一输入分布的随机数值来模拟膳食暴露的较好方法。但只有在充分了解其暴露路径、食物链中的浓度变化、食品的消费模式和其他暴露

因素后，才能充分发挥该模型的优势。

对特定亚人群的暴露评估至今也有较多问题。由于特殊人群（如婴儿、孕妇、特殊疾病患者等）的食物消费、体内代谢等与一般人群比较可能有较大差异，而目前对这些特殊人群的膳食调查数据尚不足，可能导致风险评估结果的不确定性增加。

对食物天然有毒有害成分的综合性风险评估也已成为当前的研究热点和难点，如对食物的营养价值和毒副作用的综合评估，即风险/效益评估。此外，食品有害物质在长期低剂量暴露的情况下是否也可能产生有益的“低剂量兴奋效应”？这也是有待阐明的问题。

参考文献

罗炜，陈冬东，唐英章，等. 2007. 论食品安全暴露评估模拟模型. 食品科技，2(4)：21～23

王李伟. 2008. 食品中化学污染物的风险评估及应用. 上海预防医学杂志，20(1)：26～28

吴斌，陈明生，赵昕. 2003. 风险评估在食物中天然毒素方面的应用. 食物研究与开发，24(5)：8～11

吴永宁，陈君石. 2007. 开展食品污染监测，强化暴露评估研究. 中华预防医学杂志，41(6)：435～437

Verger Ph，Fabiansson S. 2008. Recent progress in exposure assessment and its interaction with the risk analysis progress. Trends in Food Science and Technology，19：S96～S102

撰稿人：张立实　陈锦瑶

四川大学

转基因食品的非预期效应

Unintended Effects on Genetically Modified Food

1. 背景

基因修饰食品（genetic modified food）即转基因食品，是指利用基因工程技术改变基因组构成的动物、植物和微生物生产的食品。转基因技术在农作物上的应用，不但可以使农作物获得新的农艺特性而增加农作物的产量，并可改变食品的品质，将来还可利用转基因植物或动物生产药物等。特别对耕地面积相对于人口不足的我国，更具有重大的经济意义和战略意义。但同时，各国政府、学术界和消费者对由于基因插入可能带来的新的安全性问题也给予了极大的关注。转基因生物的安全风险主要有三个方面：①对环境的安全性；②对食品的安全性；③对基因操作者的安全性。转基因作物及其产品的食用安全性除了与一般食品的安全性所共有的问题外，还可能有其独特的安全性问题，即转入基因所表达蛋白质的毒性和致敏性，以及作物本身在营养成分、天然毒素和抗营养物质含量方面的变化与其他可能的非预期效应。

2. 科学意义及最新进展

何谓转基因食品的“非预期效应”？目前在科学界还没有获得达成广泛共识的答案。有学者认为，“非预期效应”是指当转基因食品/作物与其相对应的传统食品/作物在同样生长环境下，由于转基因操作中外源基因插入受体基因组位点而导致的转基因食品/作物在表现型和成分上的除目的基因所表达出的预期效应外的其他效应；也有学者认为，“非预期效应”主要是指由于转基因操作中外源基因插入受体基因组位点的不确定性所带来的效应，有可能导致转基因生物体内发生一系列不可预期的变化。部分学者更是将这种非预期效应分为两类：可解释的非预期效应（predictable unintended effects）和不可解释的非预期效应（unpredictable unintended effects）。在进行食用安全性评价时，对受体植物的关键成分、抗营养成分或（和）代谢产物的含量变化进行分析，对外援基因的特性分析也可以在一定程度上说明代谢特征等方面的变化。由于外源基因“非预期效应”的不可预见性，对外源基因组与植物基因组之间可能存在的复杂的相互作用及由此产生的非预期效应也了解得很少。在进行转基因食品食用安全性评价中，转基因食品的“非预期效应”是转基因食品安全评价学术领域的一个最有争议的概念，也是安全评价方面的科学难题。无论可解释的“非预期效应”和不可解释

的“非预期效应”在进行风险评估时，都必须将其考虑在内。然而需要注意的是，“非预期效应”是在科学研究中经常出现的，或在某种程度上说，是在创新的科学研究中有时不能避免的。在农业领域，“非预期效应”并非只出现在转基因食品的研究中，在传统作物的研究中同样会出现染色体倒位、缺失等“非预期效应”；而且并没有证据表明与传统作物相比，转基因植物表现出更高的非预期效应率。同样，即使存在“非预期效应”，并不等同于这种转基因食品的“非预期效应”会对消费者的健康造成损害。有些“非预期效应”与健康毫无关系，甚至不排除有些“非预期效应”会降低毒性物质的含量。一般认为，只有当转入目的基因表达蛋白的功能、结构发生改变以至于增加了潜在的过敏或中毒的可能性时，才会造成健康危害。

3. 主要难点

由于常规的特定成分分析难以准确测定“非预期效应”，因此目前对非预期效应的检测方法主要包括采用基因组学、蛋白质组学、代谢组学等组学技术手段。基因组学研究是指对目的对象的结构基因群、调控性序列群和非编码 DNA 片段群及其表达产物（mRNA 群）的研究。基因组学研究方法包括 DNA 测序技术、实时 PCR 技术、限制性片段长度多态性分析、等位基因特异性寡聚核苷酸杂交术等。蛋白质组学可以描述各种类型蛋白质所具有的特征，包括翻译后修饰、蛋白质-蛋白质互动等的研究，这方面的资料是对基因组学的重要补充。蛋白质组学技术既包括传统的生物化学和免疫化学技术，也包括随仪器科学发展而来的质谱技术。代谢物组学主要研究机体内所感兴趣的代谢物，这些代谢物是比蛋白质和多核苷酸分子小的物质，代谢组学技术包括质谱分析方法、磁共振质谱分析方法等。采用组学的研究方法进行转基因食品“非预期效应”的研究，可以对转基因食品在基因表达和化学组成上进行总体的评价，而不是只针对某些特定基因、蛋白质和代谢物。采用这种技术，会生成海量数据，生物信息学和计算机科学的参与可以将“组学”技术与危害识别和安全性评价联系在一起。这种成分或差别的存在与数量可能会很好地显现出来，这样无疑会得出一个更加完整的食品/作物研究数据库。对海量数据谨慎的解读，既可以增加对复杂代谢网络和植物生理学的了解，又能优化对转基因食品特定成分的分析。目前最大的难题就是对数据的解读极其有限。

4. 展望

目前对“非预期效应”的检测还没有公认的方法，在各国或国际组织也没有推荐的指南。然而明确并且规范化的技术方法应该是值得提倡并且是很有必要的，因为这有可能回答什么是转基因食品的“非预期效应”、如何评价“非预期效应”。

参考文献

陈乃用. 2003. 实质等同性原则和转基因食品的安全性评价. 工业微生物,33(3):44～51

A König,A Cockburn,RWR Crevel,et al. 2004. Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops. Food and Chemical Toxicology,42:1047～1088

Cellini F,Chesson A,Colquhoun I,et al. 2004. Unintended effects and their detection in genetically modified crops. Food and Chemical Toxicology,42:1089～1125

Frewer L,Lassen J,Kettlitz B,et al. 2004. Societal aspects of genetically modified foods. Food and Chemical Toxicology,42:1181～1193

Jensen KK, Sandoe P. 2002. Food safety and ethics. the interplay between science and values. Journal of Agricultural and Environmental Ethics,15:245～253

Kuiper HA,Kleter GA,Kok EJ. 2001. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. The Plant Journal,27(6):503～528

Louise VT Shepherd,McNicol JW,Ruth Razzo,et al. 2006. Assessing the potential for unintended effects in genetically modified potatoes perturbed in metabolic and developmental processes. targeted analysis of key nutrients and anti-nutrients. Transgenic Res,15:409～425

Millstone E,Brunner E,Mayer S. 1999. Beyond substantial equivalence. Nature,401:525～526

撰稿人:徐海滨　李晨汐
中国疾病预防控制中心营养与食品安全所

营养与智商的关系

Effects of Nutrients on Human Intelligence Quotient（IQ）

人体从开始发育就离不开各种营养物质，即营养素和能量。医学的发展已经揭示了人体的构造和功能。人的智力也就是智商，是由神经系统决定的，神经系统的发育是智商发育的基础。因此，影响神经系统不同生命阶段发育的多种营养素必然会影响到智商的发展。许多医学研究已经为营养与智商的关系提供了科学证据，营养的好坏能够影响人的智商，尤其是对婴幼儿的智商发展有较明显的影响。其证据主要有以下几个方面：

1. 叶酸补充可降低神经管畸形发生率

神经管畸形是中国和世界上许多国家发生率最高、后果最严重的出生缺陷之一，也是造成胎儿和婴儿死亡以及儿童残疾的主要原因之一。据估计，世界上每年约有30万神经管畸形的新发病例，中国占世界的1/4～1/3。神经管畸形严重影响出生人口素质，导致智障或智商低下。

20世纪80年代，世界各国针对以前的研究线索进行了一些专题研究，尤其是英国Smithells、美国疾病预防控制中心Mulinare、澳大利亚大学Bower和Stanley和美国波士顿Milunsky等进行的4项研究，共同提示了一条极为重要的病因和预防措施的线索：妇女孕早期体内维生素缺乏可能是神经管畸形发生的主要原因；如果妇女从妊娠前开始和在怀孕早期能及时增补多种维生素有可能预防神经管畸形的发生。

1984年，英国医学研究会开始了一项包括英国、匈牙利、澳大利亚等7个国家31所医院参加的随机对照试验研究。研究对象为曾经生育过神经管畸形儿、准备再次怀孕的妇女。结果显示从怀孕前1个月到怀孕后3个月每天服用4mg叶酸制剂的妇女再次生育神经管畸形儿的机会比不服用叶酸制剂妇女减少72%，预防效果显著。1992年，匈牙利Czeizel等完成的一项研究证实了妇女怀孕前1个月到怀孕后3个月内每天服用0.8mg低剂量叶酸可以预防神经管畸形的初发。从以上两项研究可以得出结论：妇女怀孕早期体内叶酸缺乏是神经管畸形发生的主要原因。

我国对叶酸缺乏的关注始于1981～1982年，在调查围生儿死亡原因时，发现死亡者中有1/3为神经管畸形。北京医科大学出生缺陷监测中心于1985年开始调查研究，发现我国神经管畸形发生率为2.3‰～3‰，其分布存在明显的地

区差别、城乡差别和季节差别，即北方高于南方，如山西16‰，河北10‰，山西等省的部分山区高达40‰以上，农村高于城市、冬春季高于夏秋季。

1991年，北京医科大学与美国疾病预防控制中心合作，沿着叶酸缺乏的方向进行了深入的研究。通过大范围的调查发现我国妇女每日叶酸摄入量只有50μg，仅达到膳食推荐标准（0.4mg）的12.5%。

自1993年10月至1995年9月在中国神经管畸形高发区的山西省和河北省、低发区的江苏省和浙江省21个县市共247 831名妇女中进行叶酸补充观察。观察结束时，未服药妇女中分娩胎儿或婴儿的神经管畸形率，北方为4.8‰，南方为1.0‰；而服药妇女中的神经管畸形率北方为1.0‰，南方为0.6‰。结果说明，妊娠前后服用0.4mg叶酸增补剂可以使北方地区妇女神经管畸形发生的危险大大降低。

2. 碘营养与智商发育

微量营养素碘对人体健康影响的研究首先是从地方性甲状腺肿和地方性克汀病开始的。然而，随着科学证据的积累，人们发现缺碘的损害远不止这两种表现形式。20世纪80年代以来，科学家们注意到缺碘对人类的主要损害不再是地方性甲状腺肿，而是造成不同程度的智商发育落后，严重影响病区的人口素质。即使对居住在缺碘地区的所谓正常人来说，也很难排除因缺碘而造成的生长、发育、智商的轻微影响，他们实际上也是缺碘的受害者，只是表现程度不同而已。1983年，Hetzel提出了“碘缺乏病”的术语来命名因缺碘而造成的一系列影响及广泛的病理谱带，突出了病因，使人们从最初的甲状腺肿的概念转移到全新的认识水平上来，即缺碘主要影响脑功能，对生长发育造成全面影响。“碘缺乏病”的概念反映了缺碘对人类健康损害的全貌，从轻至重以及临床损伤，过去所讲的地方性甲状腺肿与地克病不过是碘缺乏病的两个明显表现罢了。然而对于长期居住或出生于缺碘地区的居民来讲，特别是他们的下一代，缺碘的损害则是广泛的，在人生的不同时期对智商发育都会产生影响。

缺碘损害可以通过纠正碘缺乏而得到预防；多数障碍可以通过碘缺乏的纠正而得到有效治疗；但有的损害，如胎儿期的智商发育障碍则是不可逆的或大部不可逆的。

中国是受碘缺乏严重威胁的国家之一，据20世纪60～70年代估计，全国各省、自治区、直辖市均存在程度不同的碘缺乏，约有4.25亿人口生活于缺碘地区，占全国人口（10亿）的40%，分布于1762个县、26 854个乡。据20世纪70年代开展防治前的粗略统计，地方性甲状腺肿患者3500万，典型地方性克汀病患者25万。病区（主要为中重度病区）学龄儿童的智商IQ值比正常人低10%～15%，而病区每年约出生600万人，这将严重影响儿童的智商发育。如此众多的弱智儿童的出生对我国人口素质和经济文化的发展带来了难以弥补的损

失。针对这种状况，我国开展了卓为有效的碘缺乏防治行动，颁布了《食盐加碘消除碘缺乏危害管理条例》等法规。在经过以碘盐为主、碘油为辅的大规模防治后，病情迅速减轻，我国碘缺乏病的大规模猖獗流行得到了有效的控制，到20 世纪 90 年代全国几乎没有新发的克汀患者出生。2002 年的监测结果显示，碘盐覆盖率已达 95%，甲状腺肿发生率已下降至历史的最低水平，仅为 5.6%。实施食盐加碘后人群的总体智商提高了近 12 个点，数千年来因碘缺乏所造成的智力损害的局面得到了根本的扭转。

3. 锌营养与智商发育

锌存在于脑中的各个部位，是脑组织细胞稳定的一个重要因素。锌对脑的正常发育及维持神经正常功能具有重要作用。机体缺锌可使脑海马部缺锌，影响突触的传导。锌缺乏还可使脑细胞分化过程减慢并出现分化异常，使神经递质的反应性全面降低。在出生前后的重要时刻饮食中供锌不足会产生严重先天性脑畸形，即便是短暂的缺锌，也会导致成年后持久的行为改变，包括长期记忆、短期记忆及学习活动均受到损害。研究发现，低智商儿童发锌含量显著低于正常儿童组。

有研究者对小学 7～13 岁低智商儿童和正常儿童的 IQ 值及其发中锌含量进行测定。结果表明，低智商儿童发锌含量（99.5±18.1）显著低于正常儿童(106.4±21.3)。这一结果说明儿童智商低下与机体锌含量降低有关。另一项研究对 4～7 岁儿童的血锌含量与儿童智商的关联性进行了比较，发现儿童血锌与知识得分存在正相关，认为适宜量的锌对儿童智商发育起到保护和促进作用。

还有学者认为锌与精神疾患，尤其是抑郁及多动症有关。临床抑郁患者血锌含量低于正常人，因此有人认为低血锌可以作为抑郁治疗中的一个参考指标。许多研究表明，在产后妇女和老年人中，血锌含量低的人群容易发生抑郁。

多项研究都表明，体内锌含量与智商存在显著的正相关关系。

4. 铁营养与智力发育

铁是人体中最多的必需微量元素，缺铁性贫血是世界上最普遍的营养问题之一。2002 年中国营养调查结果显示，我国居民总体贫血患病率为 20.1%，其中婴幼儿、育龄妇女、老年人为易感人群。

大量证据表明，铁缺乏可引起心理活动和智商发育的损害及儿童的认知能力下降，并且在补铁后也难以恢复。动物试验显示，短时期铁缺乏可使幼小动物脑中铁含量下降，补铁后可纠正体内铁储存，但对脑中铁没有作用。对此有专家提出了以下推测：铁缺乏可导致 DNA 合成障碍；同时缺铁可导致血红蛋白合成不足，引起大脑及全身细胞缺乏，进而影响智商及脑功能。铁是神经系统发育极为重要的、必需的营养物质，脑吸收铁的高峰期是大脑发育期，此时也正是髓鞘形成的高峰期。因此，铁的缺乏会给大脑的神经发育带来不同程度的损害，这也是

婴幼儿期铁缺乏会对智商损害的原因。缺铁性贫血的婴儿其 Bayley 精神评分分值和运动分值与正常儿之间存在显著差异，表现为易激动或对周围事物缺乏兴趣；青少年缺铁表现为注意力不集中，学习记忆能力下降。美国的一项研究对 6 个月大的婴儿进行为期 6 个月的铁补充，结果显示补铁组婴儿的精神行为发育好于对照组。研究认为在婴儿出生的第一年恰当进行铁补充可有效地预防缺铁性贫血，同时有利于婴儿的智商发育。贫血婴儿经补充治疗后虽然可以改善血红蛋白的浓度，但却不能提高智商发育分值，提示在脑发育的关键时期铁的缺乏会造成不可逆的损伤。

一项纵向研究的结果显示，2 岁和 4 岁的严重缺铁性贫血儿童总 IQ 值显著降低。Hurtado EK 等利用美国妇女-婴儿-儿童项目数据，在排除出生体重、母亲受教育程度、性别、种族、母亲年龄等因素影响外，研究发现儿童发生轻中度智能发育迟缓的危险几率随贫血严重程度而增加。研究提示，消除儿童早期贫血有助于减轻儿童后期教育负担。

5. 其他营养素与智商发育

其他营养素与智商发育的研究也有少量报道，但尚需积累更多的研究证据。

维生素 B_6 缺乏者有易受刺激、易出现神志错乱等神经精神症状。维生素 B_6 缺乏对幼儿的影响较成人大，调查发现在食用罐装配方奶粉的婴儿（其中维生素 B_6 摄入量＜1mg/d）中发现有烦躁、肌肉抽搐和癫痫样惊厥、呕吐、腹痛、体重下降及脑电图异常等临床症状。补充维生素 B_6 后这些症状消失。

维生素 B_{12} 缺乏可能导致严重的神经功能紊乱，尤其是婴幼儿的精神发育迟缓。维生素 B_{12} 缺乏与叶酸缺乏一样可引起高同型半胱氨酸血症，而高同型半胱氨酸血症不仅是心血管疾病的危险因素，还可对脑细胞产生毒性作用而造成神经系统损害。近来研究提示，同型半胱氨酸对降低认知功能有一定的作用。高同型半胱氨酸和低叶酸水平者，在单词记忆和短小故事细节描述方面的能力明显降低。

除 B 族维生素对智商发育有一定作用外，金属元素钙和铜也被认为与智商有关。钙缺乏时可见神经、肌肉兴奋失调，引起肌肉痉挛等症状。儿童一旦缺钙，可导致神经肌肉兴奋性增加，产生激动、烦躁不安情绪，使注意力不能集中，从而影响到学习能力和智商发展。在一项 7～13 岁低智商学生和相同数量的对照组儿童进行的发中钙含量比较分析中发现，低智商儿童发钙平均含量为 670.4×10^{-6}，显著低于正常智商儿童 694.7×10^{-6}。

铜也是人体必需的微量营养素，最早关于人体铜缺乏的报告是 1964 年在蛋白质和能量营养不良的婴儿恢复期时发现伴有铜缺乏。铜缺乏常常与其他营养素缺乏同时存在，但症状较轻。铜还参与铁的代谢，铜缺乏时可发生不同程度的贫血。一项 4～7 岁健康儿童的发铜含量与智商相关性的研究结果显示，发铜与智

商值之间具有显著正相关关系。

6. 营养与智商有多大关系

以上种种证据已经证明营养与智商有关。但是，由于智商是多因素综合作用的结果，包括遗传、教育、生活环境的影响等。其中到底营养与智商有多大的关系目前还难以回答。当前的困难是缺乏相应的研究方法，动物实验很难观察其智力发育，结果也很难外推到人体；针对人体如何开展研究以及如何解决存在的伦理学问题等。然而，我们相信随着科学技术的发展和研究者的不断探索，在营养与智商的关系方面会积累更多的科学证据。其中，特别值得关注的是以下两个方面，因为人们更关注的是如何通过营养的手段来提高智商。只有弄明白了这两个方面的问题，才能着手采取营养干预的措施，提高中华民族的智力发育水平。

（1）是否存在营养素与智商之间的量效关系？叶酸、碘、锌、铁等营养素与智商间的关系已经得到了认可，但是我们仍然不知道这些营养素与智商之间是否存在着量效关系，在摄入多少营养素后会产生最理想的智商值。现代科学发现营养素对人体健康并不是越多越好，多数存在一个“U”形效应，摄入不足时会出现缺乏症状，摄入过多时则产生中毒现象。因此，我们不能一味地大量补充营养素来提高智商，必须开展专项的科学研究来揭示营养素与智商之间的量-效关系。

（2）哪种营养素起作用？通过什么机制产生作用？已有的证据显示多种营养素对智商发育有影响，但是，人的不同生命阶段，在智商发育上哪种营养素起主要作用，哪种营养素起辅助作用，通过什么机制产生作用，还缺乏科学证据。

我们已经了解了营养与智商的一些关系，但是还有太多的疑问摆在我们的面前需要继续探索。

参 考 文 献

陈祖培，阎玉芹，舒延清. 2001. 对我国全民食盐加碘后人群的碘摄入量和安全量的分析. 中国地方病防治杂志，16(3)：185～188

黄建香. 2001. 学龄儿童智商与微量元素含量关系研究. 广东微量元素科学，8(8)：24～27

李波，于雅琴，史洁萍. 2000. 微量元素铁、锌、铜与 4～7 岁儿童智商关系的研究. 中国公共卫生，16(3)：276～277

李美英，蒋卓勤. 2007. 锌、铁补充与儿童智商发育干预研究进展. 微量元素与健康研究，24(3)：64～66.

李竹，李天霖. 1994.“中美预防神经管畸形合作项目”项目单位基本状况研究. 北京：中国医药科技出版社

翟凤英，张兵，霍军生. 2005. 中国营养工作回顾. 北京：中国轻工业出版社

朱启星，朱中平，杨永坚. 2007. 血中金属元素含量与儿童智力的相关性分析. 中国学校卫生，28(4)：316～318

DiGirolamo AM，Ramirez-Zea M. 2009. Role of zinc in maternal and child mental health. Am J

Clin Nutr ,89(3):940S～945S

Hurtado EK ,Claussen AH ,Scott KG. 1999. Early childhood anemia and mild or moderate mental retardation. Am J Clin Nutr ,69(1):115～119

WHO/UNICEF/ICCIDD. 2001. Assessment of Iodine Deficiency Disorders and Monitoring Their Elimination :A Guide for Programme Manager. Geneva :WHO/NHD/01. 1 WHO

撰稿人：张　兵　杜文雯

中国疾病预防控制中心营养与食品安全所

血液尿酸升高：是否是心血管疾病的危险因素

Increase of Uric Acid Level in Serum：Is It a Risk Factor for Cardiovascular Diseases

1. 背景

人体内的尿酸有两个来源：其一是外源性，即由食物中的核酸代谢产生，约占体内总尿酸的20%。人体摄入富含核酸的食物后，其中的核酸在肠腔内先后被降解成多核苷酸、三核苷酸、二核苷酸和单核苷酸。游离的核苷酸再被进一步降解为核苷、嘌呤碱和嘧啶碱。被肠道吸收的嘌呤碱基的代谢终产物是尿酸和戊糖。其二是内源性，即由体内氨基酸、核苷酸及其他小分子化合物合成及核酸代谢而来，约占体内总尿酸的80%。

正常人体内的尿酸生成速率与排出率相当，血尿酸值可保持在恒定状态。如果外源性嘌呤摄入过多、嘌呤合成代谢增高及（或）尿酸排泄减少，则引起血清尿酸值增高。当男性血液中尿酸钠的饱和度高于416μmol/L（70mg/L），女性高于357μmol/L（60mg/L），即为高尿酸血症（hyperuricemia，HU）。

以前一直认为高尿酸血症对人体的影响主要是尿酸盐结晶沉积在关节及肾脏而引起痛风相关的病变。近年的研究资料提示，高尿酸血症与高血压、血脂异常、冠心病、脑卒中等疾病的发生发展密切相关，引起生物医学界的日益关注。

2. 科学意义

近年的一些调查显示，处于社会转型时期的中国居民高尿酸血症的患病率明显增加。目前，我国高尿酸血症者约有1.2亿（约占总人口的10%）；男性高发年龄为50～59岁，女性则于绝经期后高发（雌激素有促尿酸排泄作用）。其中5%～12%的高尿酸血症患者会发展为痛风。我国痛风患病率在一般人群达0.84%，约有1200万人。

高尿酸血症对健康的影响不仅在于发展为痛风，更重要的是这种代谢异常与心血管疾病之间的联系。国内外的研究都表明，心血管疾病已经成为影响居民健康的重要因素。特别是高血压、血脂异常、冠心病、脑血管意外等，已经成为发达国家及一些发展中国家居民死亡率增加的首要因素。

深入了解高尿酸血症与上述疾病的关系，对于认识这类疾病的发生机制，对于探讨其早期诊断方法以及预防和治疗措施，都具有重要科学意义。

3. 最新进展

大量研究证明，高尿酸血症与心血管疾病及其诱发因素之间存在着紧密的联系。《高血压》（*Hypertension*）2007 年发表的论文对一批高尿酸血症的男性患者（>70mg/L）进行了为期 6 年的随访观察，受试者血压正常而且无糖尿病，无糖耐量异常或代谢综合征。研究证明高尿酸血症与高血压危险密切相关。这批人与无高尿酸血症相比较，发生高血压的危险比为 1.81；95% *CI*：1.59～2.09，即危险性增加 80%。

在 Olivetti 心脏病研究中，Jossa 等对 547 例中年男性随访 12 年，发现血尿酸水平每增加 59.5μmol/L，发生高血压的相对危险度增加 23%。血尿酸水平升高是高血压发病的最强的独立预测因子。

尿酸水平与冠心病发病密切相关也已得到临床及流行病学研究资料的证实。Bickel 等对 1017 例血管造影术证实的冠心病患者的尿酸及其他危险因子进行检查，提示尿酸水平升高是整体死亡率的一个显著的正相关因素，作者认为尿酸是反映冠心病患者病死率的独立预警因子。Niskanen 等评估了研究人群的各种危险因素，排除了肾脏功能和糖尿病对心脑血管危险的影响后发现，高尿酸血症仍显著增加心血管死亡危险 4.7 倍。

至于高尿酸血症和心血管疾病之间是否存在因果关系，诸多研究报告出现了不同的观点。Wannamethee 等调查了英国 24 个城镇的 7688 例 40～59 岁的成人，在随访的 16.8 年中发生了 1085 个主要心血管事件。作者分析认为，尿酸不是冠心病的独立危险因素，冠心病患者尿酸水平升高是血脂、胰岛素抵抗、肥胖等冠心病危险因素中的一部分。Campo 等研究认为，高尿酸血症与高血压所致的靶器官损害明显相关，可能是高血压性肾硬化、肾小管功能受损、尿酸排出障碍所致。

4. 主要难点

各国学者对于尿酸在心血管疾病中的作用进行了广泛的研究，肯定了二者之间存在密切相关的关系。但对二者间是否存在因果关系未能得到明确的结论。

一些研究与上述报道不同，得出了否定高尿酸血症是心脑血管疾病的独立危险因素的结论。有人对血尿酸水平与心血管疾病的危险因素如高血压、血脂异常等进行分析，未发现其关联性。还有一些研究证明尿酸是血浆中重要的抗氧化剂之一，可以清除过氧化物、羟自由基等。尿酸在生理浓度和各种 pH 条件下均具有保护红细胞膜免受脂质过氧化及由氧化损伤导致红细胞破裂的作用，故认为尿酸是一种重要的内源性自由基清除剂和抗氧化剂。结合流行病学研究，他们否定高尿酸血症是心血管病的危险因素，而认为血尿酸水平增高是抑制疾病状态下氧化应激的代偿机制。

从营养学的角度分析，以前预防高尿酸血症及痛风的膳食干预措施主要限于

控制高嘌呤食物及酒精的摄入。但是研究证明内源性尿酸代谢紊乱较外源性来源重要得多。而且高尿酸血症的发生涉及机体嘌呤代谢紊乱更复杂的机制，可能与能量、脂肪乃至多种微量营养素的摄入量有关。如何通过合理膳食途径预防高尿酸血症的发生及其危害，也是今后需要深入研究的一个问题。

参考文献

Alderman M, Aiyer KJ. 2004. Uric acid: role in cardiovascular disease and effects of losartan. Curr Med Res Opin, 20: 369～379

Becker MA, Jolly M. 2006. Hyperuricemia and associated disease. Rheum Dis Clin North Am, 32(2): 275～283

Kawamoto R, Tomita H, Oka Y. 2006. Relationship between serum uric acid concentration, metabolic syndrome and carotid atherosclerosis. Intern Med, 45: 605～614

Onat A, Uyarel H, Hergenc G. 2006. Serum uric acid is a determinant of metabolic syndrome in a population-based study. Am J Hypertens, 19: 1055～1062

Petersen TS, Madsen TV, Jespersen JB. 2006. Uric acid in patients with angiographically documented coronary heart disease. Acta Cardiol, 61: 525～529

Sundstrom J, Sullivan LD, Agostino RB. 2005. Relation of serum uric acid to longitudinal blood pressure tracking and hypertension incidence. Hypertension, 45: 28～33

撰稿人：程义勇
军事医学科学院卫生学环境医学研究所

成年疾病的早期起源

Early Origins of Adult Disease

40 年前，Widdowson 和 McCance 的动物实验研究开启了成年疾病起源的研究，发现环境因素的干扰只有在生长发育的关键期才能产生远期效应。随后，对不同种系动物采取的干预研究（包括母亲营养、出生前肾上腺激素管理、子宫动脉结扎、贫血模型、改变出生后生长速度）证实这些发育“编程”可产生有害健康的效应，导致器官水平或器官系统的不良发育，进而产生远期效应。许多研究还发现了出生体重和出生后生长模式与成年疾病存在相关关系，主要关注于代谢综合征、脑卒中、高血压、2 型糖尿病、肥胖和心血管疾病等。低出生体重与不同成年疾病的相关程度存在差异。低出生体重与高血压、冠心病、2 型糖尿病、脑卒中、高血脂、凝血因子水平升高、神经发育减弱存在相关关系被广泛接受，与慢性肺病、抑郁、精神分裂症、行为问题、指纹模式、婚姻、左撇子、子宫和卵巢尺寸小、性发育过早、乳腺癌、睾丸癌的相关关系虽被报道过，但未被证实。出生体重过重与多囊卵巢综合征、前列腺癌、乳腺癌、睾丸癌、白血病的相关关系也被报道过。

近年来，大量流行病学研究及动物实验证明胎儿在宫内发育时受到遗传因素和宫内环境的影响，如孕妇营养、糖皮质激素暴露等均能影响胎儿发育“编程”，不仅会影响胎儿期的生长发育，并可能产生持续的结构功能改变，导致将来一系列成年疾病的发生。

了解成年疾病起源对开展相关疾病的一级和二级预防具有重大意义。儿童发育从一个受精卵开始，基本过程包括胚胎、胎儿、新生儿、婴幼儿和儿童。儿童发育是遗传信息的系统表达和环境信息的综合编程过程（programming，程序化），使机体形成互相联系的复杂系统，在个体复杂的自组织、自适应过程中，形成全部的生命功能和表征。发育“编程”的缺陷是儿童期，乃至成年期疾病的基础原因。应用基因组学、蛋白质组学、生化组学及功能组学研究儿童发育“编程”与疾病起源的相关关系，将为开展成年疾病儿童期预防及儿童保健工作提供理论依据。此外，儿童发育“编程”是对基因中心法则的重大发展。儿童发育“编程”从胚胎就开始了，称为宫内编程。母体营养缺乏、激素水平改变、感染和损伤等异常环境都会干扰宫内编程的过程，严重时会引起胎儿器官或器官系统结构和功能的改变，进而导致胎儿发育的异常或缺陷。出生以后，儿童发育“编

程”继续存在，特别是在婴幼儿期。在大脑的发育、神经内分泌和代谢系统的发育方面表现得尤为明显，这些编程的过程也继续受到遗传和环境因素的影响。儿童发育“编程”的影响一直持续到成年，为成年疾病早期预防提供了理论依据。这势必会对成年疾病防控策略的研究产生深远的影响。

有关成年疾病与儿童发育“编程”相关关系的机制的解释有多种，其中被普遍认同的有胎儿营养改变、类固醇激素水平增加及DNA表达的表观遗传学效应等。①胎儿营养：成人疾病胎儿起源学说激发了学者对孕期营养的关注。影响胎儿结局的因素不仅包括母体的饮食，还包括子宫胎盘血液流变学、胎盘功能和胎儿的新陈代谢，但大部分研究专注于母亲营养对儿童生长发育和疾病的影响。母亲营养不良对后代的影响可能取决于妊娠的某个特定时期，而这个时期正是胎儿发育过程的关键时间窗。对于一个营养正常的孕妇来讲，改变其营养计划可能对胎儿有害。②类固醇激素：胎儿产前暴露于类固醇激素水平较高的环境（不论这种激素来源于胎儿或母体）也决定着个体成年后的不良结局。③出生后的快速生长：低出生体重的个体成人后发生2型糖尿病、胰岛素抵抗和心血管疾病的风险增加，这种风险被出生后的代偿性生长所增强。出生到出生后两岁的婴儿期生长发育与成年疾病的关系还没有完全阐述。不同研究结果间存在差异的原因可能有BMI不能准确指示肥胖程度、失访、个体间生长发育的差异，还有人群干预研究群体大多是早产儿。④DNA表达的表观遗传学效应：个体在发育和生长过程中获得的环境影响遗传给了后代。环境表观遗传修饰通过有丝分裂和减数分裂在细胞或个体世代间遗传的机制目前还不十分清楚。

西方学者提出了多种假设去解释成年疾病起源的相关研究中所观察到的现象，其中最具影响力的是Barker的“成年疾病的胎儿起源”假说（fetal origin of adult disease)。胎儿起源假说认为，胎儿宫内不良反应使其自身代谢和器官的组织结构发生适应性调节。如果营养不良得不到及时纠正，这种适应性调节将导致包括血管、胰腺、肝脏和肺脏等机体组织和器官在结构上发生永久性改变，进而演变为成年疾病。这一发育“编程”过程可被许多环境因素放大，从而增强和加速成年疾病的发展过程。此假说引起了国际学者的广泛关注，开展了许多流行病学和动物研究。

为促进胎儿健康和疾病的发育起源研究，健康和疾病的发育起源（the developmental origin of health and disease，DOHaD）研究中心于2000年在英国南安普顿成立。DOHaD是指如果人类在发育过程的早期（包括胎儿、婴儿、儿童时期）经历不利因素（子宫胎盘功能不良、营养不良等），将会影响成年糖尿病、心血管疾病、哮喘、肿瘤、骨质疏松、神经精神疾病的发病。DOHaD学说认为除了基因和成年期环境外，宫内和出生早期环境也会对某些成年疾病的发生发展产生关键性影响。DOHaD学说包括三个假说：节约表型假说、发育可塑性

假说和预知适应反应假说。节约表型假说是指胎儿在发育过程中，如遇不利的生长环境，将改变其发育轨道，尤其是降低生长速度来适应此环境，但这种永久性改变是对以后生长发育不利的。发育可塑性是指胎儿在细胞分化的关键期对外界环境变化敏感，并且有适应环境变化的能力。发育可塑性对母体营养敏感，在母体营养缺乏的情况下，可影响胎儿的发育可塑性，进而导致成年疾病。预知适应反应是指发育中的胎儿能预测未来环境变化，并且可以通过改变其发育轨道以适应所预知的环境。若预知适当，预测环境与未来实际环境匹配，则具有进化优势；若预知不适当，预测环境与未来实际环境不匹配，发育成熟的器官不能适应可塑期以外的环境，则导致将来成年疾病的发生，且不匹配越多，导致的疾病风险越大。

2003 年，世界卫生组织和联合国粮农组织（WHO/FAO）专家在关于饮食、营养和预防慢性疾病的联合报告中指出：子宫内生长迟缓，引起冠心病、脑卒中、糖尿病和血压升高的危险性升高；最佳的出生体重和身长分布很重要，其不仅影响近期的发病和死亡，而且会产生长期结果。这一报告肯定了生命早期发育直接影响成年后健康及疾病的易感性。研究表明，在生命早期发育过程中，表观遗传起了关键作用。表观遗传是指基于非基因 DNA 序列改变所导致的基因表达的变化，涉及范围包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰及微小 RNA，一个基因型可拥有多个表型。表观遗传过程易受生命早期环境因素的影响，其中孕期营养是影响表观遗传的关键因素。有证据表明，孕期营养对后代的影响不仅仅在两代之间，而且可能传递几代，对后代的患病风险具有深远影响。阐明疾病的发展和起源，确定表观遗传的靶点，探索在生命早期发育可塑窗口期进行营养干预的方法，将是促进人类健康、预防慢性疾病的关键环节。

为揭示儿童发育“编程”与疾病起源的关系，应加强多学科、多中心研究，从基础生物学如分子遗传学到临床流行病学、卫生经济学、社会学、临床医学、营养学等多方面来研究，对影响成人健康与疾病的从胚胎到出生后各方面因素进行研究。

儿童发育“编程”与成年疾病的起源方面有很多难题有待进一步研究，已成为少儿卫生与妇幼保健领域亟待解决的问题之一。

(1) 儿童发育“编程”的效应到底有多大？虽然许多研究支持 Barker 观点，但仍然存在批评意见。有关出生体重和出生后生长模式与成年疾病的相关关系的研究结果存在不一致。有研究认为出生体重与血压相关性的系统综述存在偏倚，样本量较小的研究阴性结果较多，存在发表偏倚。在控制发表偏倚后，出生体重与血压的相关性减弱，每千克出生体重的降低导致血压有 2 mmHg 的上升，这个效应是很小的。许多研究报道了出生体重与糖代谢及胰岛素代谢紊乱有关，尤其是低出生体重与胰岛素抵抗、空腹胰岛素水平升高和 2 型糖尿病发生增加有

关。也有一些证据认为低出生体重与胰岛素分泌减弱存在相关关系，但是在各研究结果间不一致。因此，相关研究也应关注儿童发育“编程”的其他生理和病理效应。

(2) 双生子的发育“编程”现象还不清楚。双生子相比单生子出生体重更轻，依据儿童发育“编程”推理，双生子成年疾病的发生率应更高。然而，双生子冠心病死亡率和血压水平与单生子之间是否有差异还没有定论，但绝大部分研究发现双生子胰岛素抵抗发生增加，更易患糖尿病。当前普遍认为双生子研究能够区分基因和环境因素对疾病发生的影响。该观点的假设前提是认为同卵双生子基因和宫内环境相同，而异卵双生子只有宫内环境相同。但宫内环境相同的条件过于理想化。双生子在生长发育过程中使用同一胎盘的不同部分，可产生不同的远期健康效应。也有研究认为双生子宫内生长发育与单生子不同，两者发育“编程”也有可能存在差异。比较双生子与单生子的远期效应的研究较少，因此双生子发育“编程”与疾病起源的研究有待加强。

(3) 早产儿的发育“编程”现象可能不仅受到胎儿生长影响，而且与怀孕周期相关。由于缺乏早产动物模型，绝大部分动物研究都专注于胎儿生长的影响。有些人群研究发现怀孕周期本身也能影响某些疾病的风险，但胎儿生长和怀孕周期对相关疾病的影响大小仍然不清楚。如果怀孕周期与成年疾病的关系确定，那么将对产科临床实践产生新的挑战，提示选择生产时间也会对儿童远期健康产生影响。

(4) 儿童发育“编程”的不良效应是否可逆？胎儿发育迟缓大多在孕晚期或出生后被诊断，对发育不良的胎儿的宫内干预措施很难实施，也很难确定改善宫内环境后是否能够逆转生理和病理变化。有动物实验的证据表明儿童发育“编程”的效应在出生后能够被逆转。但是这方面的研究很缺乏，有待进一步探索。

(5) 孕妇营养、糖皮质激素暴露、出生后的快速生长等均能影响胎儿发育“编程”，不仅会影响胎儿期的生长发育，并可能导致一系列成年疾病的发生。但是这些机制的重要程度还不确定，制约了我们对全人群采取公共卫生措施以及对高危个体采取治疗措施。

全球人群正在逐步经历西方化过程，如西方的饮食、静态生活习惯、肥胖，慢性疾病正成为影响人群健康的主要问题，而低出生体重、儿童期体重过度增加与成年疾病密切相关。因此，研究人员和政策制定者应采取积极策略，修正孕期和婴幼儿期对成年疾病产生影响的因素。尽管相关实践和研究进展缓慢，但这是促进人类健康、预防慢性疾病的关键环节，也是疾病起源研究的最终目的。

参考文献

杨慧霞. 2008. 健康与疾病的发育起源学说引发的思考. 中华围产医学杂志，11(3)：157～158

朱宗涵.2007.儿童早期发展研究的新进展:发育的“编程”理论.中国儿童保健杂志,15(1):1～3

Barker DJ. 2004. The developmental origins of adult disease. J Am Coll Nutr,23(6):588S～595S

de Boo HA, Harding JE. 2006. The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. Aust N Z J Obstet Gynaecol,46(1):4～14

Gillman MW. 2005. Developmental origins of health and disease. N Engl J Med, 353(17):1848～1850

Lucas A, Fewtrell MS, Cole TJ. 1999. The fetal origins of adult disease-the hypothesis revisited. BMJ,319(7204):245～249

Singhal A, Lucas A. 2004. Early origins of cardiovascular disease: is there a unifying hypothesis? Lancet,363(9421):1642～1645

Wells JCK. 2007. The programming effects of early growth. Early Hum Dev,83(12):743～748

撰稿人：马　军[1]　吴双胜[2]

1 北京大学

2 北京市疾病预防控制中心

青春期发动机制及其时相提前的健康效应

Mechanism of Puberty Onset and Health Implications of Early Puberty Timing

1. 背景

青春期（adolescence）是个体从童年向成年逐渐过渡的时期，一般指生命历程的第二个十年。进入青春期，个体线性生长加速，内分泌功能活跃，第二性征凸显，生殖系统功能发育骤然加快并迅速成熟，抽象思维得以发展，个性渐趋成熟。

青春发动期（puberty）是青春期初始的 4～5 年。它始于一系列复杂的、尚未被探明的神经内分泌网络的激活，而这一网络在出生后一直处于沉寂状态。青春发动和生殖能力成熟是由脑垂体分泌的黄体生成素（LH）和卵泡刺激素（FSH）分泌的改变决定的，而这些激素分泌又受下丘脑促性腺激素释放激素（GnRH）脉冲式神经分泌频率和幅度的影响。个体的青春发动时相（pubertal timing）受到源于下丘脑多种信号的影响，包括神经递质和神经肽，同时也受到外周或性腺信号的调节，这主要与遗传因素有关。环境因素包括营养、光照、应激和环境内分泌干扰物，可能通过直接影响下丘脑信号网络或通过间接影响外周信号网络对青春发动时相造成影响。由于各信号系统之间彼此互为关联，很难区分各系统的独立效应。在青春期转变过程中，个体的意外伤害和故意伤害、抑郁症状、物质滥用及进食障碍和冒险行为高发，而青春发动时相提前往往又是儿童身心健康问题乃至成年期健康的危险因素。

中国儿童青春发动时相提前现象已至少持续 20 余年，表现为儿童月经初潮、首次遗精和线性生长突增年龄明显提早。青春发动时相提前引起的心理健康问题、外向或内向性行为问题、性行为的提前、肥胖、代谢综合征及肿瘤的增加等身心健康问题，理应引起我国学者的关注。解决中国儿童青春发动时相提前的健康危害效应，需要阐明儿童青春发动的分子调控机制。

2. 科学意义

（1）揭示青春期发动基因网络和内分泌机制的科学意义：青春发动从本质上来说是一个在纷繁变化环境下，内源性-外源性交互作用敏感的生物因子参与，下丘脑脉冲释放的 GnRH 持续增加的结果。这依赖于突触传递和神经胶质细胞、神经元信息交流的协同变化，包括激活输入到 GnRH 神经元网络的神经元与胶

质的兴奋和经突触传递的抑制失活。然而，个体经历青春发动期的开始年龄、发育速度、发育水平及成熟年龄存在明显的差异，有必要深入研究中枢神经系统、下丘脑-垂体-性腺（HPG）轴系统在青春期发育启动中所起作用及其功能状态控制和影响因素。

神经生物学依然是青春期研究的重要主线，有助于理解细胞传导机制，进而再次确定 GnRH 脉冲发生器的关键作用。亟须更多研究阐明调控青春期发动“再次唤起（re-awakening）”因素的变异是否可以解释目前人类所展现的青春期发动时相与发育速度的变化趋势。在青春发动相关指标超越年龄界值的儿童群体中开展内分泌学、遗传学和影像学研究，同时引入心理社会变量如应激（stress）等，将有助于青春期病理生理学机制的解答，同时也能为临床治疗新模式的引入带来一线光明。

（2）阐明青春发动时相提前健康效应的公共卫生学意义：Petersen 和 Taylor 在 20 世纪 80 年代初即提出，青春发动时相的异常（提前或推迟）可能造成青春期甚至成年早期情感及行为问题。与青春发动时相提前相关的不良结局涉及多个方面，包括心理健康、躯体健康、性行为、社会和学业方面，其中心理（精神）病理学症状及行为问题因影响青少年的社会适应而备受重视。关注青春发动时相提前的青少年心理（精神）病理学，为青春发动时相提前的青少年提供心理支持，提高青少年应对相关压力的能力，增强社会适应能力。

个体早期发育异常、青春发动时相提前与成人期健康三者之间密切相关。青春发动时相提前与早期发育异常的关系往往预示成人期可能发生多种健康问题，如较矮的成人身高和较高的 BMI、多囊卵巢综合征、代谢综合征、癌症等。因此，关注儿童青春发动时相的长期趋势和个体青春期时相提前对健康的不良影响，加强对人群监测、化学筛查和毒理学试验，有利于推动学者对青春发动时相提前与健康关系及其潜在机制的研究。

3. 最新进展

（1）青春发动基因网络中一些基因和因子的作用被揭示：青春发动是个复杂的基因网络，相关的 GnRH 脉冲发生器抑制机制涉及众多因素。青春发动期的改变主要取决于跨突触修饰（modifications in transsynaptic）和 GnRH 神经元网络的神经胶质传输。机体的这些调控系统的组分不断地被人们所认识。例如，除了广泛存在于前脑基底部谷氨酸神经元（glutamatergic neuron），下丘脑含有能利用 Kisspeptin 进行神经传递和刺激 GnRH 释放的神经元。这些神经元也产生神经激肽 B 和抑制 GnRH 释放的阿片类物质，如强啡肽。最近研究显示，神经激肽 B 也是与人类青春发动有关的基因编码的肽类物质，GnRH 分泌的兴奋性跨突触调节是由利用谷氨酸、Kisspeptin 和神经激肽 B 作为神经传导和神经调节的神经元提供的。而有抑制作用的神经元有 γ-氨基丁酸神经元和类阿片神经元。

最近的研究还表明，哺乳动物中RFamide有关肽类基因（RFRP）能够抑制GnRH神经元活性，

青春发动的激活不仅与跨突触传输有关，还与神经胶质细胞有关。后者是通过产生促进GnRH分泌的细胞间的信号分子得以实现的，并且是调节青春发动时相的重要机制。神经胶质细胞对GnRH分泌的影响有两种相关机制，一种包括生长因子，例如转化生长因子-β（TGF-β）被具有丝氨酸-苏氨酸激酶活性的细胞膜受体识别；其他如表皮生长因子家族（EGF）、胰岛样生长因子-1（IGF-1）等由具有酪氨酸激酶活性的受体识别。另一种机制是对细胞间黏附作用可塑性的重新调节。至少有两种细胞间通讯系统，一种是由突触细胞黏附分子-1（SynCAM-1）提供，另一种是由神经元接触蛋白与胶质受体样蛋白酪氨酸磷酸酶-β（RPTP-β）相互作用所致。

上述激活与抑制系统中的基因和分子研究较为深入的是Kisspeptin /GPR54系统。2003年，3个独立的研究小组发现G蛋白偶联受体GPR54为青春期的分子开关，Kisspeptin（由kiss-1基因编码的一组肽类激素）是GPR54的内源性受体激动剂，Kisspeptin与GPR54共同调节着青春期的发育，GPR54被认为是青春期发动的"守门人"（gatekeeper）之一。Kisspeptin对HPG轴作用的主要机制是，Kisspeptin直接作用于GnRH神经元上的GPR54受体（大约有75%的GnRH神经元共表达GPR54），激活GnRH神经元释放GnRH，继而导致促性腺激素（LH、FSH）的释放。动物和人类实验均表明下丘脑Kisspeptin和GPR54表达的增强是青春期启动的关键环节，两者共同调节青春期GnRH的脉冲式释放。

(2) 环境内分泌干扰物在青春发动时相提前中的作用得到高度关注：青春发动时相人群变化特征原因的假说目前尚不统一，近年来一个主要的假说是环境内分泌干扰物（environmental endocrine-disrupting chemical，EDC）暴露导致青春发动提前。

EDC作为一种具有干扰体内正常内分泌激素的合成、释放、转运、代谢、结合等过程的外源性化学物，广泛存在于日常生活用品中，如塑料制品、阻燃剂、农药等。一些EDC具有与雌激素相似的化学结构，因此易与雌激素受体结合，并激活受体产生类似雌激素样效应，引起性发育提前（precocious puberty，PP)。这些EDC包括DDT、多氯联苯（PCB)、双酚-A（BPA)、多溴联苯（PBB)、邻苯二甲酸酯类、硫丹（endosulfan)、阿特拉津（atrazine）和玉米赤霉醇（zeranol）等。

EDC种类繁多，结构差异较大，对机体的生物学效应仍不明确。鉴于青春发动时相的改变主要是因HPG轴和下丘脑-垂体-肾上腺（HPA）轴的改变引起，也与生理事件、肾上腺皮质功能初现（adrenarche）和肾上腺激动剂有关。

一般认为，EDC引起儿童发育异常的可能机制：一是儿童对EDC敏感，EDC干扰儿童体脂及其生长发育的过程；二是EDC还可以改变内分泌系统正常的结构和功能。这种干扰效应可分为两种：①直接作用，指通过作用于下丘脑-垂体-靶腺轴的任一环节，影响激素的合成、分泌及反馈调节，产生不良效应，如出生后接触EDC可直接通过影响中枢下丘脑、垂体和靶腺、乳房发育而影响性早熟。②间接作用，指与内分泌改变密切相关的效应，如生殖、免疫、内分泌敏感性肿瘤等。动物实验表明，EDC与动物体内非性激素受体结合，可产生一种全新的反应，并间接影响正常激素的生理作用。这种生物学效应包括对内分泌系统和生殖与发育的影响、致癌作用、神经系统毒效应和对免疫系统的影响等。

(3)我国儿童青春发动期成熟事件提前现象仍在持续：欧美等发达国家儿童青春发动时相提前的长期变化趋势已经减慢甚至停止。在我国，从1985年开始的每5年一次的“中国学生体质健康研究”资料较为清楚地显示，青少年青春发动时相提前的长期趋势逐渐显现，且以农村地区尤为显著。与1991年相比，2005年9～18岁乡村、城市女生月经初潮年龄分别提前0.31岁和0.16岁；男童首次遗精年龄在1995～2005年的10年间，平均提前了1岁，具有明显的逐渐提前的趋势。

4. 主要难点

(1)青春期发动相关的分子生物学机制和神经内分泌学机制：青春期的生物学模式与促性腺激素和性激素（如睾酮）浓度密切相关。这一过程的重要组分即童年期的“抑制期”是否解除进而允许再次激活，主要依赖于遗传或者某些内源性机制。

Ojeda等（2009）提出了青春期发动基因网络控制的转录控制假说，认为在童年期一组基因能强烈抑制其下游基因，如转录调节因子Ttf1、Eap-1、Oct2等及次级基因如Kiss1；强啡肽、RFRP等抑制青春期转录遏制的作用可以忽略。因而，下丘脑GnRH神经元处于抑制状态。进入青春发动期，促进基因转录激活升高，青春发动延迟基因的阻遏得到加强（图1）。然而，从宏观上看，哪些基因处在青春发动网络中核心地位（hubs）？哪些基因又处在附属地位并执行来自“核心”的指令？在这一基因网络中，哪些基因是“后备力量”？在一个通路失能时，其后备通路能否立即激活？这些都需要进一步阐明。

(2)青春期发动时相遗传和环境因素的交互作用：遗传和环境因素单方面阐明人类青春发动的机制及其健康影响效应都较为困难。应整合青春期研究中遗传和环境两部分研究成果，全面系统分析和探讨营养（膳食结构）、环境暴露、家庭、体力活动水平、社会心理应激等对不同基因型携带者青春发动时相异常的效应，这应成为青春期研究的主要方向和趋势。

遗传和环境对青春期发动的交互作用可从以下几个方面探讨：不同基因型的

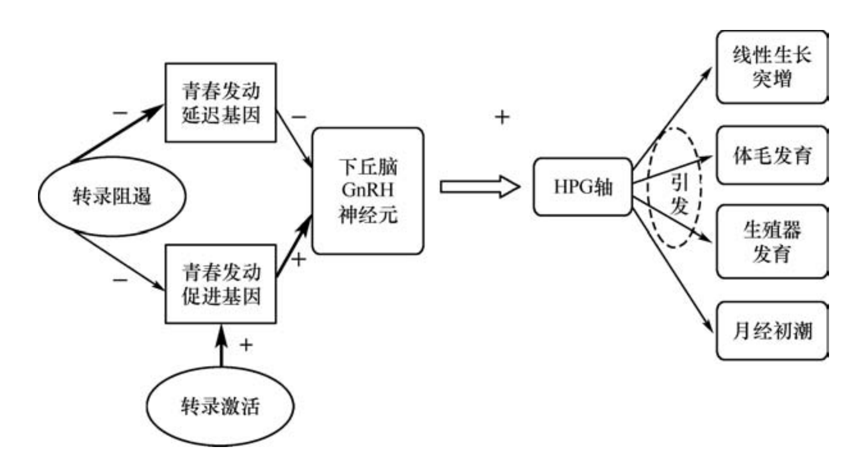


图 1　青春发动激活网络和结果

－，抑制；＋，激活；箭头的粗细反映了激活或抑制的强度。修改自 Ojeda SR，et al. 2010. Mol Cell Endocrinol

青少年中，相似的环境暴露是否会造成青春发动时相的不同；或不同环境暴露的人群中，不同的基因型青春发动时相是否也具有差别，即携带不同的遗传易感基因型儿童青少年中，环境因素对青春期启动效应是否有差别；或是探明在不同的环境暴露下，某易感基因型对青春发动的效应是否有差别。同时，还应鼓励方法学上的创新，如在传统病例对照研究基础上发展单纯病例对照设计、病例父母对照设计、病例同胞设计等非传统病例对照等研究方法。

（3）青春期心理行为与中枢神经系统发育的关系：脑的许多变化发生于青春期，如从解剖上看，青少年随着年龄的增长，灰质容量减少，白质容量增加。青春期发生的神经解剖学变化反映了神经连接的进一步完善，这种完善可能与青少年认知功能和情绪功能的提高密切相关。脑是性激素受体最重要的靶器官，性激素广泛地影响着神经元的进程，如神经元树突的生长、突触的形成和突触棘密度增加、细胞凋亡、神经肽的表达及神经递质的敏感性。青春期与皮质成熟是否完全同步发生，或是偶然关联尚不清楚。这一问题的解答有助于对青少年心理障碍的预防和童年期情绪和行为问题持续至青春期的临床干预。大脑对青春期性激素波动在不同时期有着不同的应答模式，这一应答模式是否存在性别差异、青春期性激素浓度是否足以引发局部脑结构改变等研究争论，应成为青春期与中枢神经系统发育研究的优先领域。

（4）建立大型队列，阐明青春发动时相提前的身心健康效应：建立我国儿童青春发动多种重要事件发育进程时间表，为判定青春发动时相提供依据。建立大型中国儿童青春发育队列，开展多中心研究，阐明环境暴露和发育的敏感期或关键期，以期进一步从人群角度评价早期发育模式、体脂含量及其分布、教养方

式、社会心理应激等与青春发动提前的剂量反应关系及其病因关联，同时全方位了解青春发动提前对儿童身心健康的即时影响和终身效应。

参考文献

Bhasin S. 2007. Experiments of nature—a glimpse into the mysteries of the pubertal clock. N Engl J Med, 357(9): 929～932

Buck Louis GM, Gray LE Jr, Marcus M, et al. 2008. Environmental factors and puberty timing: expert panel research needs. Pediatrics, 121 (Suppl 3): S192～S207

Carel JC, Léger J. 2008. Clinical practice: precocious puberty. N Engl J Med, 358(22): 2366～2377

Clarkson J, Han SK, Liu X, et al. 2010. Neurobiological mechanisms underlying kisspeptin activation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons at puberty. Mol Cell Endocrinol, 28: 10～16

Delemarre EM, Felius B, Delemarre-van de Waal HA. 2008. Inducing puberty. Eur J Endocrinol, 159 (Suppl 1): S9～S15

Euling SY, Selevan SG, Pescovitz OH, et al. 2008. Role of environmental factors in the timing of puberty. Pediatrics, 121(Suppl3): S167～S171

Mead EJ, Maguire JJ, Kuc RE, et al. 2007. Kisspeptins: a multifunctional peptide system with a role in reproduction, cancer and the cardiovascular system. Br J Pharmacol, 151(8): 1143～1153

Ojeda SR, Dubay C, Lomniczi A, et al. 2010. Gene networks and the neuroendocrine regulation of puberty. Mol Cell Endocrinol, 324(1-2): 3～11

Patton GC, Viner R. 2007. Pubertal transitions in health. Lancet, 369 (9567): 1130～1139

Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, et al. 2003. The GPR54 gene as a regulator of puberty. N Engl J Med, 349(17): 1614～1627

撰稿人：陶芳标

安徽医科大学

儿童青少年生长发育时间性的生物“密码”控制

Deciphering Determinants in Timing of Child and Adolescent Growth and Development

1. 研究背景

儿童青少年生长发育的整个过程受到遗传和环境多种因素的交互作用 (图 1)。青少年生长发育时间性受生物“密码”控制假说已为大量研究结果所证实，如青春发动时相在相同种族人群、同一家庭以及双卵双胎和单卵双胎之间存在高度相关性。大量资料显示，青春发动时间性的差异 50% ～80% 由遗传因素引起。虽然自然环境、社会心理因素、营养、疾病及青春发动时间性的长期变化趋势对生长发育存在明显的影响作用，但是在这些影响作用的背后隐藏着生物“密码”的重要调控作用，并且在人类 2 万年的进化长河中无时无刻不在发挥着作用。

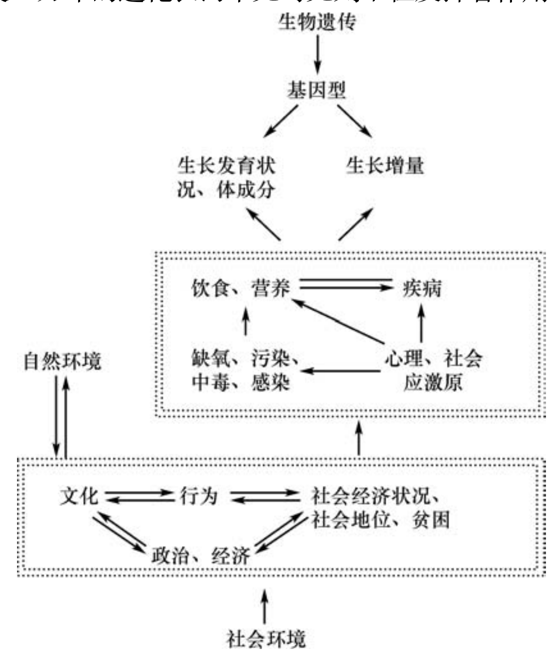


图 1 儿童青少年生长发育影响因素

修改自 Ulijaszek SJ. 2006

近年来，学者们试图以低促性腺激素性腺功能减退（hypogonadotropic hypogonadism，HH）和卡尔曼综合征（Kallmann syndrome，KS）的遗传研究为突破口，破解儿童青少年生长发育时间性的生物“密码”。但是，现实并非如此简单！儿童青少年生长发育时间性是一系列极其复杂的过程，表观遗传学研究证实基因型与表现型严格“一一对应”的关系并不存在，它可能受到多基因或遗传和环境的交互作用的复杂网络调控。

2. 科学意义

生长发育的一般时间顺序性是指大多数儿童在生长发育过程中所具有的共同现象，虽然由于各自受到的遗传、环境多种因素的作用不同，最终导致个体生长和发育的时间有早有晚，速度有快有慢，即每位儿童生长发育的表现都有特殊性，但同时又大体遵循一定的时间规律。

掌握人体各系统生长模式的时间顺序性，对于一个群体、地区和民族来说，可以了解正常值范围的变动；对于个体来说，生长发育的时间性除性别差异外，还有提前和延迟之分。在预防各年龄阶段的易发病和矫正先天性疾病或畸形方面，更需要掌握人体生长发育的客观规律和正常值标准，才能适时地加以预防和治疗。

“关键期”学说也充分体现了儿童青少年生长发育的时间性。关键期（critical period）是指某种知识或行为经验，在某一特定时期最易获得和形成，经过了这一时期，就不能获得或达不到最佳水平。Scott 认为生长发育关键期应该符合以下原则：不能变更的生长发育过程；具有明显可识别的界限或者范围；对快速变化非常敏感。

研究发现，儿童在出生和 1 岁时其身高主要受到环境因素如营养、疾病等影响（>50%），遗传作用相对较小。然而 2 岁以后，儿童身高大小差异的 91%～97% 都可以被遗传因素所解释。并且儿童青少年身高与遗传因素关联的大小随着年龄增大而增强，儿童中期遗传作用的大小达到高峰，青春期后新的遗传因子开始发挥作用。由此可见，了解儿童青少年生长发育的关键期，在不同关键期采取特定的干预手段防止不良因素的干扰，对提高妇幼保健卫生服务水平、促进儿童健康意义深远。

3. 最新进展

（1）群体水平研究发现生物“密码”的研究线索：迄今为止，绝大多数研究基于以个体为单位研究儿童青少年生长发育的时间性。然而，群体水平研究结果却能提供大量的研究线索。例如，研究发现月经初潮的时间在不同种族或具有不同血统的人群中表现不一。因此，许多学者提出血统可能与青春发动的生物学标志存在关联的研究假说。在拉丁美洲人群中，欧洲血统增加和印第安人血统降低与月经初潮推迟存在统计学关联。在美国本土夏威夷人群中，纯夏威夷血统的增加、欧洲血统和东亚血统的降低与月经初潮提前存在统计学关联。然而，在白种

人和非洲裔美国人群中未发现血统与月经初潮存在统计学关联。血统与月经初潮的关联强度较小，因此它不能作为不同种族之间月经初潮存在差异的完全证据，仅能提供进一步探讨的线索。

双生子研究结果表明，同卵双生子之间青春发育指标的一致性明显高于异卵双生子，提示青少年青春发育明显受到遗传因素的控制。

(2) 单基因遗传病研究揭示生物“密码”的遗传学基础：近年来在 HH 和 KS 的研究上取得的卓越成果使人们开始不断认识参与调节下丘脑-垂体-性腺轴（HPG）的众多基因。伴有正常嗅觉 HH 被证明与编码促性腺激素释放激素受体（GNRHR）、G 蛋白偶联受体 54（GPR54）及 GPR54 内源性天然高亲和力配体 kisspeptins（KISS-1 的编码产物）基因的变异存在统计学关联。GNRHR 是第一个被发现与常染色体隐性遗传的 HH 有关联的遗传物质，HH 患者 GNRHR 基因突变频率估计在 3.5%～10.4%。最近，研究发现 GNRH1 的突变也可能是诱导 HH 发生的遗传学基础。研究者从一例体质性生长和青春发育期延迟（CDGP）青少年中发现了部分功能变异的 GNRHR，提示 CDGP 也可能受到 GNRHR 的调控。KISS-1/GPR54 系统是 HPG 轴的一个重要组件，是青春发动不可或缺的重要因子。Kisspeptins 与 GPR54 结合后在青春发动上发挥重要的作用，然而 KISS-1/GPR54 系统是否为青春发动的“触发器”及是否存在其他的调节效应至今未明。

在 X 染色体上 Xp22.3 的位置，有一个基因称为 KAL1，此基因突变属于性联遗传。KAL1 基因有 14 个外显子，大小为 210 kb。研究发现，KAL1 和成纤维细胞生长因子受体 1 基因（FGFR1）与 KS 发生存在显著关联，两者共同作用可以“贡献”KS 发病原因的 20%。此外，最近研究确定了编码 prokineticin 受体-2（PROKR2）的基因在 KS 病因中的作用，PROKR2 是一个 G 蛋白偶联受体，prokineticin 信号通路在嗅觉和 HPG 轴发育中的作用至关重要。KAL1 和 PROKR2 在 KS 中共同发挥作用，提示 KS 也可能是一种多基因遗传病。

考虑到 KS、HH 及 CDGP 在临床上存在相似之处，因此参与它们发病的致病基因中可能存在重叠基因。如图 2 所示，FGFR1 是 KS、HH 和 CDGP 的共同致病基因。GNRHR 同时参与 HH 和 CDGP 的调控。PROK2、PROKR2 及 FGF8 基因变异可能会同时诱导 KS 和 HH 的发生。

4. 主要难点

(1) 基因网络研究展示生物“密码”控制的前景：通过 KS、HH 及 CDGP 的遗传学病因研究发现，GNRHR、GPR54、KISS-1、TAC3、TACR3 等基因变异可以引起青春发动时间性的异常或青春期的一些疾病。由此，我们可能会认为儿童青少年生长发育时间性可能通过某些特异的单个基因来调控。然而，事实并非如此，因为没有任何单个基因可以在青春发动上发挥“全能”作用，它必须依赖其他基因或由基因网的协助方能完成。最近的观点认为 KISS-1 并不是控制

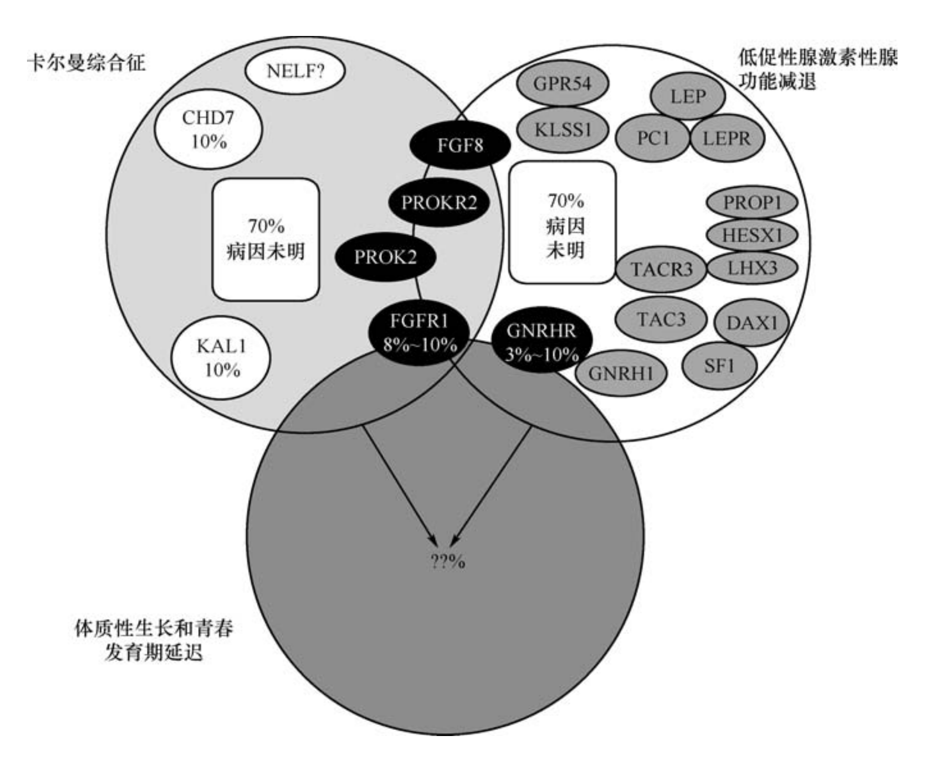


图 2 儿童青少年生长发育时间性的遗传学基础
修改自 Gajdos ZK，et al. 2010

青春发动时间的基因，KISS-1 表达的神经元在雌二醇生成过程中被激活表达。调节青春发动的神经内分泌机制并不是通过孤立的途径或者细胞子集完成的，这种观点也逐渐为日益深入的研究所证实。多基因网络的观点再一次被一项全基因组关联研究所证实，该研究揭示 LIN28B（编码 RNA 结合蛋白的基因）的序列变异与月经初潮提前存在关联，并且至少存在 9 个其他基因的序列多态性与月经初潮提前存在关联。以上研究结果均能被一个早期提出的假说所支持，即青春发动期是由多种功能模块的基因网络调控的，并且该基因网络是错综复杂的而非严格的等级关联。

（2）环境-遗传-内分泌系统交互作用对人类生长发育的调节机制：环境应包括营养和食物、地理位置、气候对体格大小和体型的影响、气候对生长发育季节性速率的影响，同时还应拓展到移民和城市化、社会经济状况、社会稳定性等相关领域。

（3）开拓人类生长模式的发育生物学研究：除了探索直接影响生长的生物文化因素、调节个体发育的内源性和外源性因素，以及生长发育生物数理方法的创新之外，还应注重剖析生物-文化交互作用对人类生长的影响，社会、经济和政治对人类生长发育的影响等。

（4）人类生长发育长期趋势及其差异性的解码：人类生长的长期变异趋势，包括以人群为基础的生长发育的差异、生长速率的差异性、生长发育的性别差异、骨骼、牙齿和性发育的人群变异性、遗传和环境交互作用在其中的效应、身体比例、体格大小和体型、体成分的人群差异等。

生长是一个复杂的进程，同时也是生命历程中最重要的一篇。体格大小不仅在细胞增殖中有重要作用，也在某种程度上决定个体的寿命。体格大小在人类进化史上表现出大幅增加的特点。

综上所述，人类完全揭示儿童青少年生长发育时间性的生物“密码”控制奥秘是一项漫长而艰苦卓绝的生命科学的基础性工作，这项工作对于提高妇幼保健卫生服务水平，促进儿童健康成长的深远意义不言而喻！

参考文献

Chan YM，de Guillebon A，Lang-Muritano M，et al. 2009. GNRH1 mutations in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. Proc Natl Acad Sci USA，106(28)：11703～11708

Cole TJ. 2009. Growth and organ development. Adv Exp Med Biol，639：1～13

Gajdos ZK，Henderson KD，Hirschhorn JN，et al. 2010. Genetic determinants of pubertal timing in the general population. Mol Cell Endocrinol，324(1～2)：21～29

Gajdos ZK，Hirschhorn JN，Palmert MR. 2009. What controls the timing of puberty？an update on progress from genetic investigation. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes，16(1)：16～24

Kaminski BA，Palmert MR. 2008. Genetic control of pubertal timing. Curr Opin Pediatr，20(4)：458～464

Mustanski BS，Viken RJ，Kaprio J，et al. 2004. Genetic and environmental influences on pubertal development：longitudinal data from Finnish twins at ages 11 and 14. Dev Psychol，40(6)：1188～1198

Ojeda SR，Dubay C，Lomniczi A，et al. 2010. Gene networks and the neuroendocrine regulation of puberty. Mol Cell Endocrinol，324(1～2)：3～11

Silventoinen K，Pietiläinen KH，Tynelius P，et al. 2008. Genetic regulation of growth from birth to 18 years of age：the Swedish young male twins study. Am J Hum Biol，20(3)：292～298

撰稿人：郝加虎[1]　徐　勇[2]　陶芳标[1]

1 安徽医科大学

2 苏州大学

儿童青少年肥胖发生机制

The Mechanism of Children and Adolescents Obesity

肥胖是指体内热量摄入大于消耗，脂肪细胞增多或细胞体积增大或两者同时存在，造成脂肪在体内积聚过多，与其他成分失去正常比例，导致体重超常的病症。肥胖在全世界范围流行且日趋严重，在儿童青少年中的流行也非常明显。发达国家儿童青少年肥胖检出率高达 10%～20%。在我国，随着生活水平的提高，生活方式的改变，高热量、高脂肪、高糖食物大量增加，加之膳食结构不合理、体力活动减少等原因，儿童肥胖率也持续上升。2005 年全国学生体质与健康调研结果显示，7～22 岁城市男生超重和肥胖检出率分别为 13.25% 和 11.39%，城市女生超重和肥胖检出率分别为 8.72% 和 5.01%，乡村男生超重和肥胖检出率分别为 8.20% 和 5.07%，乡村女生超重和肥胖检出率分别为 4.61% 和 2.63%；在一些大城市如北京、上海，儿童青少年的超重和肥胖检出率平均可达 10% 以上，某些年龄段甚至超过 20%。全国儿童期单纯肥胖症流行病学研究的结果显示，1996 年及以后与之前的 10 年相比，儿童肥胖率大幅上升，并且发生年龄前移，1986 年报告称单纯肥胖症是学龄期严重的健康问题；而 1996 年的报告结论则是单纯肥胖症是学龄前儿童严重的健康问题。十年巨变凸现了我国儿童单纯肥胖症不容乐观的态势。因此，肥胖已成为儿童青少年卫生领域亟待解决的问题之一。

肥胖不仅对儿童青少年生理、心理及社会适应能力产生不良影响，而且可持续到成年期，与高血压、冠心病、糖尿病、高脂血症及某些肿瘤等疾病密切相关，严重威胁人类健康。认识儿童肥胖的起因，研究儿童肥胖的发生机制，将为儿童肥胖预防和针对性干预提供理论依据。

儿童肥胖的病因十分复杂，发生机制至今尚未完全明确，但已公认遗传因素、环境因素及环境-基因交互作用可能与肥胖发生有关。迄今为止，过度营养、体力活动少、行为偏差等环境因素被认为在中国儿童单纯性肥胖发生中发挥主导作用。近年来研究表明遗传因素在肥胖发生中也发挥重要作用。各种致病因素之间相互关联，很难评估独立效应的大小，以至于在不同研究中环境和遗传因素的作用程度不能统一。遗传因素决定肥胖的易感性，但个体是否真的肥胖，须由环境因素决定。因此，在肥胖机制研究中，环境因素和遗传因素仍是并行的两条线索，但考虑到遗传因素可能影响对环境因素的易感性，环境-基因交互作用的研

究也将有助于揭示肥胖的发生机制。

越来越多的证据表明，肥胖流行源于那些促进过多的热量摄入和久坐生活方式的环境因素。多项研究发现高脂膳食、非母乳喂养，以及不吃早餐、多食用西式快餐和软饮料摄入较多等饮食习惯及随着社会模式转变所带来的运动方式的改变（体育锻炼和体育活动减少以及静态生活时间延长）等与肥胖直接相关。这些肥胖危险因素中的一部分在实验室中也得到了证实。以高脂饮食为例，在一项高脂膳食致大鼠肥胖实验研究中，高脂饲料组（脂肪含量27.8%）内37%的大鼠发生肥胖，而正常饲料组（脂肪含量7.9%）大鼠中无一发生。2002年中国居民营养状况调查显示，城市居民油脂消费量由2000年的37g/d增加到2002年的44g/d，脂肪供能比达到35%，超过世界卫生组织推荐的30%的上限，也超过中国居民膳食指南推荐量（30g）。城乡居民脂肪摄入量增加也非常快速，1992年较1982年增加9g，2002年较1992年增加18g。高脂饮食可能是中国居民肥胖发生率升高的一个重要原因。

社会心理情绪也影响肥胖的发生。儿童肥胖的社会心理行为因素包括个性、处世方式、认知、交际、父母心理及对自己体态的满意度等方面的异常。不良进食心理也是肥胖发生的重要危险因素，“看见别人进食自己也想吃”最有利于肥胖的发生，这说明进食心理似乎比摄食行为更能影响肥胖的发生。运动心理和运动行为有很大关系，认为体育运动很重要、喜欢体育运动、看见别人运动自己也想积极参与以及晚饭后经常活动等这些积极的运动心理，能够使孩子得到更多的活动机会，而经常运动能够避免脂肪在体内的蓄积，预防肥胖症的发生。研究发现，4～9岁儿童肥胖的发生与压抑、焦虑等心理问题所引起的低预期性、低持久性和注意力不集中、缺乏毅力、易受环境干扰等不良的气质特征有关。情感创伤（家庭变异、父母离异、死亡等）、精神紧张和心理障碍如家长的溺爱包办造成儿童胆小、依赖、孤僻、社交不良等都可引起肥胖。

另外，在影响肥胖发生的社会经济因素研究中，也有许多线索：地域、经济发展水平、文化程度和社会文化传统等对人群的肥胖率有不同程度的影响。这些因素在不同的国家和地区与肥胖的关系也不尽相同：在发达国家社会经济状况和肥胖发生率成反比，而在发展中国家，肥胖发生率却随社会经济状况的改善而增加。

在中国儿童单纯肥胖症危险因素的研究中，环境因素的作用可能大于遗传因素，室内活动量明显降低、主食量和肉食量高及水果和蔬菜量低、进食过快等因素是肥胖发生的危险因素，人工喂养、过早添加固体食物（生后1～2个月）和断奶过早也是促成单纯肥胖症产生的因素。另外，家长的动机因素如对儿童超量喂养起着重要作用，这是中国儿童肥胖的主要驱动力。

同其他许多慢性疾病一样，肥胖也有广泛的遗传基础。研究者运用大量的流

行病学调查和干预的方法，在不同群体中进行研究（如病例对照研究、双生子研究、核心家庭研究等），现已初步阐明个体遗传易感性在特定的促体重增加环境中的作用。不同的肥胖表型包括体重指数（BMI）、皮褶厚度、局部脂肪分布、热量摄入代谢率和热量消耗、休息时的代谢率等均受遗传因素影响。

ob（肥胖）基因是第一个被发现可能导致肥胖发生的单基因，其编码的蛋白质产物被命名为瘦素（leptin）。在人群中与 ob 基因同源的肥胖基因（LEP）的结构序列隐性突变可导致瘦素缺乏，进而引发肥胖。LEP 基因发现后，又相继发现其他可导致单基因肥胖的基因，如瘦素受体基因（LEPR）、黑色素皮质激素受体 4 基因（MC4R）及脑源性神经营养因子基因（BDNF）等主要是在下丘脑摄食中枢和饱食中枢及其附近核团表达的基因，这些基因参与调节人体摄食行为和能量代谢平衡。然而单基因模型并不能解释人群中普遍流行的肥胖，这就促进多基因肥胖模型的研究。

目前的理论模型认为，常见肥胖是一种多基因疾病或复杂疾病，是多个基因作用的累加结果。多基因肥胖中，各个基因对于肥胖的发生是微效的，其在肥胖个体中有大量表达，在正常体重或低体重个体中表达较少。目前针对性的研究方法主要为候选基因研究（Candidate Gene Study）和全基因组关联研究（Genome-Wide Association Study，GWAS）。

常见肥胖的遗传研究是基于对基因组 DNA 变异的分析即单核苷酸多态性（SNP）研究。根据 2005 年版的“人类肥胖基因图谱”总结，244 个基因的突变或表达异常可导致体重和肥胖表型的改变。基因突变与肥胖表型的相关性研究报道不断更新，127 个肥胖候选基因被证实与肥胖有关。这些基因具有很多生理功能，如调节食物摄取、能量消耗、脂糖代谢、脂肪组织形成及最近发现的参与炎症反应，并主要通过影响饮食行为、能量平衡和物质代谢而引发肥胖。但研究表明单基因肥胖中发现的突变基因，在普通肥胖发生中的作用并没有比其他候选基因显著。

随着 GWAS 研究的应用，肥胖遗传病因研究取得很大的进展。迄今为止，除 FTO、MC4R 之外，发现几十个新基因与肥胖或肥胖相关表型有关，这些基因包括 TMEM18、SH2B1、MTCH2、NEGR1、KCTD15、ETV5/DGKG 等。这些基因在肥胖发生中的作用尚未明确，但是为肥胖机制研究提供了新的线索。随着 GWAS 研究的深入发展，越来越多可能在肥胖进程中发挥作用的基因将被逐次发掘，一些关键基因有望在接下来几年中被证实。

普遍认为，遗传因素在多基因肥胖的发生中起着很大的作用，而且与环境因素交互作用促进肥胖。Perusse 和 Bouchard 研究双胞胎之间能量平衡的差异时发现，相同基因型的受试者比不同基因的受试者能以更相似的方式应对能量过剩和缺乏。不同的移民研究也为环境-基因交互作用提供了线索。在美国和欧洲，移

民是一个持续不断的大规模的社会现象，并且往往是迁入国里社会地位较低的少数群体。研究显示，这种低社会经济地位和少数民族地位似乎与超重和肥胖呈现高的流行有关，尤其在妇女和儿童青少年中。Sylvia Kirchengas 对来自土耳其和前南斯拉夫移民儿童及奥地利本土的青少年所进行的一项研究显示：在儿童和青少年女性移民中，每一个年龄组比奥地利本土对照有更高的超重和肥胖率。男性移民人群的结果没有达到统计学意义，但是超重或肥胖的风险在土耳其或南斯拉夫的移民儿童青少年中更高。回归分析结果显示，移民能促使超重或肥胖的发生。在西方，移民似乎成为儿童青少年发生肥胖的一个特殊的危险因素。

环境因素的研究有助于认识肥胖发生，但是环境因素导致肥胖的机制却并未阐明。多项环境因素的作用相互交叉，例如，吃早餐与有更多总体力活动和看电视时间减少相关，其中任何一个因素都可能有助于能量平衡，即不吃早餐所导致的肥胖可能受每日总能量摄入和能量消耗的调节；地域影响肥胖发生，可能与不同地区经济发展的差异性或不同地区饮食行为和生活习惯不同有关，也可能与气候环境等原因导致人群体力活动模式的差异有关。寻找独立的致肥胖环境因素仍需进一步的研究。另外，环境因素的作用需通过一定的生理过程来实现。例如，母乳喂养减缓肥胖的发生可能与母乳中含有的某种物质能使中枢-激素系统产生印记从而控制食物摄取有关，母乳喂养时，精确和可靠的过饱点的形成是通过内在的生理功能来支配的，而不是外在的社会因素。但是这种理论还需要更加严格的实验研究来验证。

遗传因素研究发现肥胖与基因多态性有关。但是 GWAS 研究所发现的相关基因大多功能未明，其作用于肥胖发生的效应通路仍未知。例如跨膜蛋白基因18（TMEM18），研究显示该基因所编码的蛋白质表达于神经前体细胞的内质网，可能与神经前体细胞向神经胶质细胞的转化有关，如何诱发肥胖仍需进一步研究。针对儿童青少年与成人肥胖的差异，有研究显示有些成人肥胖相关的基因可能在儿童肥胖中的作用不显著。虽然不能排除研究效能较低，但是研究者认为具有神经功能的基因可能在成人中作用更加明显，而代谢通路的基因在儿童中更为显著。儿童肥胖是否具有不同于成人肥胖的特殊通路也需进一步探讨。

另外，GWAS 研究中发现的某些 SNP，或位于相关基因的内含子，或位于某个基因的启动子区及周围，甚或是某些基因的附近不能具体划分归属。这些 SNP 并非经由导致某些氨基酸的非同义突变引发相关通路的异常而导致肥胖发生。明确这些基因如何作用于肥胖发生，将有赖于细胞生物学和生物化学的发展。

肥胖相关基因作用的总和只能解释肥胖发生的一部分原因。基因-基因、环境-基因的交互作用的分析提示，某些基因可能通过与其他基因或环境因素的交互作用使肥胖促进效应扩大，甚至某些在人群研究中未能观测到与肥胖相关的基

因，可能通过交互作用来发挥作用从而促进肥胖发生。例如，BDNF 基因 rs6265 多态性可能影响肥胖发生，在一项相关研究中，rs6265 单独与肥胖无关联，但可通过与多巴胺 D4 受体基因产生交互作用而与暴食症患者的 BMI 相关。交互作用的研究可能从已有研究结果中发掘出更多的信息，但研究显示，调查研究所采用的方法，如某些环境暴露因素的调查是否采用被调查者自述报告或采用不同方法检测不同的独立研究人群的同一指标，都有可能造成研究间的巨大差异，使研究重复的可能性微乎其微。严格控制的大规模人群调查与前瞻性的队列研究仍是研究肥胖机制的重要环节。但是，受限于前瞻性研究的漫长性所造成的样本缺失及低的依从性、人群研究现场的复杂调度及遗传研究高昂的费用，这种研究方法的普及尚需社会因素的改善。

参 考 文 献

李东海，喻荣彬，徐耀初. 2003. 儿童肥胖发病机制研究进展. 预防医学情报杂志，19(1):24～26

中国学生体质与健康研究组. 2007. 2005 年中国学生体质与健康调研报告. 北京：高等教育出版社，142～159

Epstein LH，Paluch RA，Gordy CC，et al. 2000. Decreasing sedentary behaviors in treating pediatric obesity. Arch Pediatr Adolesc Med，154：220～226

Hill JO，Peters JC. 1998. Environmental contributions to the obesity epidemic. Science，280：1371～1374

Kaplan AS，Levitan RD，Yilmaz Z，et al. 2008. DRD4/BDNF gene-gene interaction associated with maximum BMI in women with bulimia nervosa. Int J Eat Disord，41(1)：22～28

Rankinen T，Zuberi A，Chagnon YC，et al. 2006. The human obesity gene map：the 2005 update. Obesity (Silver Spring)，14(4)：529～644

World Health Organization. 1997. Obesity：preventing and managing the global epidemic〔R〕1 Report on a WHO Consultation on obesity. Geneva：World Health Organization，(WHO/NUT/NCD/981)

Yamada Y，Kato K，Kameyama T，et al. 2006. Genetic factors for obesity. Int J Mol Med，18(5)：843～851

撰稿人：王海俊　马　军

北京大学

化妆品中环境雌激素与乳腺癌的关系

The Relationship Between Environmental Estrogens in Cosmetics and Breast Cancer

1. 背景

近年来乳腺癌发病率呈明显上升趋势，已成为城市女性的第一杀手。资料显示，1982～2001年北京城区女性乳腺癌发病率平均每年递增4.6%；英国英格兰和威尔士女性乳腺癌的发病率从1979年的74.4/10万上升到2000年的113.8/10万；上海女性的乳腺癌发病率1972年为17/10万，1992年上升到34/10万，2000年迅速上升至56.2/10万，而2008年则上升至62.5/10万。

什么原因导致城市女性乳腺癌的发病率上升？流行病学研究表明，只有5%～10%的乳腺癌与遗传有关，其余90%与环境因素和生活方式密切相关。英国学者Darbre博士长期从事乳腺癌与化妆品中环境雌激素的研究。她根据化妆品的成分、使用部位、乳腺癌的位置、乳房肿瘤组织中环境雌激素含量和化妆品销售量与乳腺癌的发病率关系等研究，发现抗汗剂和除臭剂类化妆品中羟基苯甲酸酯等环境雌激素与乳腺癌存在联系。

2. 科学意义

化妆品的使用涉及大量人群，关系到公众的健康。鉴于乳腺癌的发病率不断提升，并集中在城市的事实，化妆品中环境雌激素与乳腺癌关系自然引起社会上和科学界的关注。

化妆品含有多种化学物质，最多的配方含有近百种，其中有些成分如植物雌激素、邻苯二甲酸酯、烷基酚对羟基苯甲酸酯、三氯生等具有雌激素效应，有些美容、健美类化妆品违法掺有性激素，如避孕药。由于化妆品经常涂抹于乳房、腋下等女性敏感部位，残留在皮肤上，不但直接、连续地与皮肤接触，而且连续吸收，不经消化系统代谢，以原型化合物积累在皮下组织中。通过化妆品中环境雌激素与乳腺癌关系的研究，可建立目前环境与健康研究中涉及低剂量、多组分化学物质对人体长期暴露安全性评价的典型案例，对环境卫生领域具有重要的科学意义。

3. 最新进展

大多数化妆品含有多种化学成分，其中有些成分具有环境雌激素性质，如羟基苯甲酸酯（尼泊金酯）、邻苯二甲酸酯、烷基酚、紫外线吸收剂、植物雌激素

等。化妆品中环境雌激素通过涂抹与皮肤接触进入人体，特别是含有多种雌激素的美乳类化妆品、抗汗剂和除臭剂，使用时与乳房及周边皮肤频繁接触，化妆品中雌激素成分在乳房组织中积累。

美乳类化妆品、抗汗剂和除臭剂一般涂抹于女性乳房或靠近乳房的腋下，而乳腺癌大多数靠近腋下乳房，位于乳房的上外侧。调查发现，1926 年 31% 乳腺癌位于乳房的上外侧，而 1994 年乳腺癌位于乳房的上外侧上升到 60.7% ，该调查结果提示乳腺癌发生与使用化妆品存在相关性；另外，调查发现，美国乳腺癌的发病率与使用抗汗剂和除臭剂类化妆品呈正相关。

羟基苯甲酸酯主要用作化妆品的防腐剂，各国化妆品卫生标准对化妆品中羟基苯甲酸酯限值不同，但化妆品中羟基苯甲酸酯含量一般不能超过 1% 。1995 年对 215 份化妆品调查发现，99% 驻留式化妆品含有羟基苯甲酸酯，77% 即洗类化妆品含有羟基苯甲酸酯。

羟基苯甲酸酯多年来被认为是安全的，但近年来发现羟基苯甲酸酯具有环境雌激素效应，能促进人体乳腺肿瘤中 MCF7 人乳腺癌细胞生长。Darbre 等选取 20 个乳房肿瘤组织进行检测，发现 18 个样品含有对羟基苯甲酸酯。

上述证据表明，化妆品的防腐剂羟基苯甲酸酯可能与乳腺癌相关。但美国化妆品盥洗用品和香精协会（CTFA）强调，美国市场上绝大多数抗汗和除臭产品中并不含有羟基苯甲酸酯。而且来自 CTFA 的 Chris Flower 博士特别指出，从进一步的研究结果可以判定，还没有确切的证据表明，乳腺癌的发病率和使用止汗剂和除臭剂有关。因此，还不能说明羟基苯甲酸酯对乳腺癌的发病率有直接的影响。

美国 FDA 根据“美国化妆品盥洗用品和香精协会”下属的“美国化妆品成分评估委员会”（CIR）评价对羟基苯甲酸酯的对人体安全性结论，认为化妆品中羟基苯甲酸酯是安全的。目前，化妆品中羟基苯甲酸酯和乳腺癌之间的联系仍在激烈争论中。

4. 主要难点

（1）化妆品的成分及雌激素效应：目前，世界各国化妆品法规要求化妆品包装须进行全成分标识。美国从 1976 年、日本从 2001 年、韩国从 2008 年就开始要求化妆品全成分标识；我国《化妆品通用标签》要求化妆品须标全成分于 2008 年 6 月 17 日由国家质量监督检验检疫总局与国家标准化管理委员会联合发布，于 2010 年 6 月 17 日开始执行。虽然化妆品全成分标识列出了化妆品的成分，但没给出各成分的含量，而且哪些成分具有雌激素效应、雌激素效应当量如何，化妆品包装上标识的成分是否与配方一致，这些问题导致目前缺少化妆品的成分及环境雌激素效应的基础数据。要解决上述问题，需进行以下研究工作：

一是建立各类化妆品中各种环境雌激素的测定方法，用于测定化妆品中环境

雌激素的种类和含量。由于化妆品成分（基体）复杂、成分变化大，每个产品中每类环境雌激素测定方法的适用性需进行方法验证，这导致了缺乏统一的标准分析方法。由于市场上化妆品品种繁多，从分析化学上需进行大量的方法建立和样品测定，导致分析成本增加，这是难点之一。

二是建立环境雌激素检测及活性的生物测定方法，包括单一化学成分和化妆品混合物的雌激素效应测定。由于环境化合物是否具有雌激素效应不能单从分子结构上推测，要通过科学试验加以证明，因而形成了许多检测其生物活性的方法如子宫增长实验。要获得化妆品环境雌激素效应的基础数据，可通过测定每种成分的雌激素效应，然后结合化学分析数据，假定每种成分具有协同效应进行计算；也可直接测定每个化妆品产品的雌激素效应。但如上所述，由于化妆品的成分和产品繁多、剂型复杂，要获得化妆品的成分及环境雌激素效应的基础数据，将面临着现有雌激素效应测定方法的适用性和测定成本的难题。

（2）化妆品与乳腺癌发病率的流行病学研究：对含有环境雌激素化妆品是否会引起乳腺癌的发病率增加，要得出令人信服的流行病学科学结论，涉及排除许多混杂因素，包括化妆品的涂抹方式、使用部位、使用频率、使用时间，使用者的生活方式、饮食习惯、遗传，以及不同年龄、种族对化妆品中化学成分的吸收效率等。众多的混杂因素将影响调查结论，是研究化妆品中环境雌激素与乳腺癌关系的最大难点。

参 考 文 献

王启俊，祝伟星，邢秀梅．2006．北京城区女性乳腺癌发病死亡和生存情况20年监测分析．中华肿瘤杂志，28(3)：208～210

Darbre PD，A Aljarrah，WR Miller，et al．2004．Concentrations of parabens in human breast tumours．Journal of Applied Toxicology，24：5～13

Darbre PD．2005．Recorded quadrant incidence of female breast cancer in Great Britain suggests a disproportionate increase in the upper outer quadrant of the breast．Anticancer Research，25：2543～2550

Darbre PD．2006．Environmental oestrogens，cosmetics and breast cancer．Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism，20(1)：121～143

Darbre PD．2005．Aluminium，antiperspirants and breast cancer．Journal of Inorganic Biochemistry，99：1912～1919

撰稿人：林少彬

中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所

耐辐射奇球菌超强辐射抗性究竟来自何处

Where Are the Extremely Radioresistance of
Deinococcus Radiodurans from

Deinococcus radiodurans（即 *D. radiodurans*）对诸多外界环境因素的极端抗性吸引了全球的科研工作者至今半个世纪的探索和研究，随着研究的深入，其超强抗性机制初现端倪。

1. 本身特殊的结构特点

D. radiodurans 属于红色微球菌，多呈二联体和四叠体生长，4 个室均含有一个完整的基因组，每个室内含有一条完整的环状染色体。Smadar 等认为，这种特殊的类核环状体结构使断裂片段互相靠近，有利于同源重组方式的高效运行。尽管到目前为止，抗辐射菌超微结构变化是否与辐射抗性相关尚没有定论，但 *D. radiodurans* 菌基因组的多拷贝特点无疑为菌体高效同源重组修复提供了条件。

2. 高效的 DNA 修复能力

目前研究较为明确的 DNA 修复主要有以下几种：片段末端同源重组（homologous recombination）、非同源末端连接（non-homologous end-joining，NHEJ）、染色体内和染色体间单链退火（intra- and interchromosomal single-strand annealing）、延伸合成依赖式退火（extended synthesis-dependent strand annealing，ESDSA）。

3. 高效的抗氧化能力和氧自由基清除能力

耐辐射球菌细胞中 SOD 的活性比大肠杆菌高出 6 倍，CAT 的活性更是比对照的大肠杆菌高出 30 多倍。近期研究发现，锰离子能够清除超氧离子，有效保护 ROS 反应所致的氧化应激损伤，从而保证修复的顺利进行。在 *D. radiodurans* 菌抗氧化损伤物质中，类胡萝卜素、β-胡萝卜素在 *D. radiodurans* 菌的抗辐射效应中也起着非常重要的作用，它可能通过对自由基的高效清除能力和抗氧化能力起作用 。

4. DNA 损伤片段的外排

在抗辐射球菌受辐射早期，其细胞质及培养液中均发现 DNA 损伤片段。初期的降解产物主要是寡核苷酸，长约 2000 个碱基对，随后降解为核苷，快速地从细胞中排出。其具体机制迄今尚不明确，孔蛋白会不会在此过程中发挥重要作用，或者是胞内阴阳离子平衡调控导致孔道的开放，均有待进一步研究。

目前为止，耐辐射菌的抗辐射机制研究遇到较多的难题，值得深入探讨。

首先，神奇的 *D. radiodurans* 来自何处？以华跃进教授为代表的学者认为，超强的辐射抗性来源于史前经历的强烈的太阳核子爆发产生的高剂量辐射，导致地球微生物体 DNA 的重组，最终进化形成其辐射抗性。俄罗斯空间生物学研究中心的 Anatoli Parlor 博士认为，耐辐射球菌可能起源于具有强烈电离辐射的火星随着陨石落到了地球。以上假说虽然能够解释其形成原因，但目前已知辐射最强的地方为巴西的 Guarapari 钍矿周围，其辐射强度也只有 0.175Gy/年，微生物的特殊环境抗性功能的维持需要不断的选择性压力，在没有选择性压力的环境中，其超强的辐射抗性以什么机制得以维持？Mattimore 和 Battista 发现 *D. radiodurans* 的辐射抗性与干燥抗性机制具有一定的相关性。常晓松等通过紫外辐射的进化性筛选，得到耐紫外辐射能力 F_{10}（辐射后 10% 的生存剂量）高于野生株 1.64 倍的进化株，通过紫外辐照后的蛋白质组学研究，发现进化株的抗干燥基因表达水平上调，提示 *D. radiodurans* 菌抵抗干燥环境的机制可能和耐辐射机制存在交集，其具体机制还有待进一步研究。

其次，众多的抗辐射机制是怎样有机组合起来的？目前已知的抗辐射机制已经很多了，其辐射抗性是如何启动的？笔者近期研究结果表明，*D. radiodurans* 接受辐照处理后早期，多种压力感应元件表达上调，这些元件主要与氧化应激压力、金属离子及抗生素压力等感应元件相关，可见，抗辐射机制的动员在早期导致多种压力感应元件表达上调，其上调具有非特异性，那么，是否有某种转录因子作为整个系统的启动因子发挥重要作用？由于在环境压力胁迫后，菌体各基因蛋白的变化发生相当迅速，很难确定其作用机制的起始靶点。

抗辐射机制启动后，究竟哪种机制首先起作用，或是同时起作用？在紫外辐射损伤早期存在多种能量代谢途径关键酶的表达上调，究竟是能量代谢途径首先起作用，还是 DNA 修复机制首先起作用？其辐射抗性是否存在群体协同效应？如果有，是通过什么样的信号在不同的个体间传递？目前针对 *D. radiodurans* 的机制研究大多集中于体外实验研究，由于体外实验所构建的环境及各种克隆蛋白的活性相对菌体内部来说相差较大，根据其推测出的抗性机制尚缺乏直接证据，如何利用现有研究手段（如各种荧光蛋白）观察载体蛋白变化情况将是下一步需要解决的问题。

能量代谢在生物体的复制、生长、凋亡中具有重要的作用，Kamble 的文章表明，当 *D. radiodurans* 受到紫外辐射后，cAMP、ATP 和蛋白磷酸化水平升高。如果后续研究确证能量代谢与蛋白磷酸化水平或保护相关，将对于临床放疗患者的辐射防护和高剂量离子或紫外暴露人群保护提供重要的研究价值，同时为辐射防护药物的研发提供思路。

总之，对于耐辐射菌抗辐射机制研究虽然取得了一定的进展，但其神秘的面

纱仍然吸引着科学工作者孜孜不倦地去探索，其 12 000Gy 的承受能力究竟来自何处？这一难题亟待大家共同参与研究，希望谜底在 21 世纪揭晓。

参考文献

华跃进．2004．耐辐射奇球菌的起源与进化的“主动进化说”．科学中国人，6：20～21

Cox M M，Ballista JR．2005．*Deinococcus radiodurans*：the consummate survivor．Nat Rev Microbiol，3：882～892

Daly MJ，Gaidamakova EK，Matrosova VY，et al．2004．Accumulation of Mn（Ⅱ）in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance．Science，306：1025～1028

Daly MJ．2009．A new perspective on radiation resistance based on *Deinococcus radiodurans*．Nat Rev Microbiol，7：237～245

Kamble VA，Rajpurohit YS，Srivastava AK，et al．2010．Increased synthesis of signaling molecules coincides with reversible inhibition of nucleolytic activity during postirradiation recovery of *Deinococcus radiodurans*．FEMS Microbiol Lett，303：18～25

Levin-Zaidman S，Englander J，Shimoni E．2003．Ringlike structure of the deinococcus radiodurans genome：a key to radioresistance？Science，299：254～256

Mattimore V，Battista R．1995．Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*：functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation．J Bacteriol，178：633～637

Slade D，Lindner AB，Paul G，et al．2009．Recombination and replication in DNA repair of heavily irradiated *Deinococcus radiodurans*．Cell，136：1044～1055

Zahradka K，Slade D，Bailone A，et al．2006．Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans*．Nature，443：569～573

Zimmerman JM，Battista JR．2005．A ring-like nucleoid is not necessary for radioresistance in the *Deinococcaceae*．BMC Microbiol，5：17

撰稿人：常晓松　舒为群　杨　澜

第三军医大学

极低频电磁场致儿童白血病的可能性及其机制

The Risk of Childhood Leukemia and Its Possible Mechanism of Exposure to Extremely Low Frequency Electromagnetic Fields

1. 背景

儿童白血病是导致儿童死亡的最主要疾病，儿童白血病约占儿童恶性肿瘤的1/3。据世界卫生组织（WHO）统计，儿童白血病的发病率为（3～4）/10 万，我国儿童白血病的发病率约为 4/10 万。儿童白血病的病因和发病机制仍未阐明。儿童白血病病因复杂，电离辐射、有机溶剂、农药、环境烟草暴露、食物成分、病毒感染（人类 T 细胞白血病病毒)、儿童的免疫状态、细胞毒药物等均可能与儿童白血病相关，另约 10% 的白血病找不出明确病因。极低频(extremely low frequency，ELF）电磁场暴露与儿童白血病的关联最初是由美国 Wertheimer 和 Leeper 于 1979 年调查儿童白血病的危险因素时发现，并随后在一系列流行病学调查中得到印证。这些研究也因此推动了世界卫生组织癌症研究机构（IARC）对极低频电磁场进行致癌危险性评估，但缺乏一致公认的作用机制，极低频电磁场暴露对儿童白血病的影响还有待进一步阐明（2B 类致癌物)。WHO 估计每年因极低频电磁场暴露而发生白血病的儿童约达 2400 例。

2. 科学意义

虽然一些流行病学研究证明了极低频磁场暴露与儿童白血病的相关性，但由于低强度的极低频电磁场暴露缺乏明确的暴露标志物，因而增加了危险度评估的难度。2002 年，IARC 根据极低频磁场对儿童白血病的影响将强度大于 0.4μT 的极低频磁场划定为人类可疑致癌物，但低强度极低频电磁场致癌机制一直未能阐明。儿童白血病是一种复杂疾病，虽然其发病与遗传易感性有一定的相关性，但易感基因携带者并不等于儿童白血病患者，诸多环境因素（极低频电磁场等）在其发病机制的因果链条上均可能具有重要作用。随着电力行业的飞速发展，极低频电磁场已成为继空气、水和土壤污染之后的另一无所不在的环境危险因素。不同于前三种污染的是：一般公众对极低频电磁场的暴露是无意识的、被动的和连续 24 小时的，而前三种污染都是在一定程度上可以感知的。如果证明极低频磁场暴露的确是儿童白血病的病因之一，那么其对全球疾病负担的影响可能具有深远的社会意义。因此，研究低强度极低频电磁场对儿童白血病的激发机制、与遗传易感因素的交互作用机制将对儿童白血病的诊断、预防和针对性治疗提供科

学的理论依据。

3. 最新进展

极低频磁场与生物体交互作用的机制与其暴露强度密切相关。高强度（职业暴露）的极低频电磁场暴露（远超过 100μT）具有确定的生物学效应和公认的生物学机制，高强度极低频磁场可在人体内诱发感应电场，对神经和肌肉产生刺激并导致中枢神经系统的神经细胞兴奋，但一般人居环境中低强度的极低频电磁场与生物组织或结构的交互作用机制还未阐明。目前认为，低强度极低频磁场的生物学效应机制主要包括自由基机制（radical pair reaction）、磁粒子机制（magnetic particle）、信噪比机制（signal-to-noise ratio）、共振效应（stochastic resonance）、相变诱导效应（electrically induced phase transition）、连贯效应（coherence effect）、扭力场效应（effects of torsion field）及极低频磁场与流经堆积态的 DNA 碱基电流之间产生交互作用等。WHO 的环境健康基准（EHC238）则认为，低强度极低频电磁场的生物物理机制可能主要在于在神经网络诱导产生感应电场、形成自由基或形成磁晶（magnetite）。

4. 主要难点

自由基效应是相对公认的低强度极低频电磁场生物物理机制。尽管自由基效应可以在一定程度上诠释弱电磁场的生物学效应，但由于一般公众极低频电磁场的暴露强度较低，弱磁场对 DNA 不具有直接的损伤作用，因而自由基效应对造血系统的影响还有待进一步阐明。此外，越来越多的研究认为极低频磁场导致儿童白血病发病率增加的原因还可能与儿童在与用水设备或水流接触时的接触电流（contact current）效应相关，但问题是评估在儿童接触供水管道系统时的接触电流及其感应电场强度被 WHO 认为是当今亟待解决的世界科学难题。

除了没有一致公认的病理机制外，复杂的极低频磁场暴露剂量（dosimetry）也是影响阐明极低频磁场暴露对儿童白血病影响危险度评估的技术瓶颈。儿童极低频磁场暴露的来源十分复杂，即包括其在胎儿时期母体的暴露，儿童在家居环境、托幼环境及学习环境中极低频磁场的暴露，不同发育时期、不同身高和体形、不同环境、不同类型极低频磁场暴露的时间加权剂量十分复杂。此外，由于缺乏特异的生物标志物，现阶段还缺乏有效的量化剂量模型。

综上所述，极低频磁场致癌机制假说由于缺乏损耗效应（dissipative effect）估计，缺乏有实验依据的量化分析，无法排除热扰动效应对感应电场信号的干扰，因而阐明极低频磁场暴露对儿童白血病的影响机制还具有相当的难度。

5. 展望

儿童白血病的病因及发病机制仍有待于进一步探索，揭示特征性的极低频电磁辐射内暴露标志是阐明极低频磁场暴露对儿童白血病贡献的关键依据；同时极

低频电磁辐射外暴露的量化评估模型和内部感应电场评估模型将有助于深入研究造血系统对不同频率极低频电磁场的强度响应阈值。此外，尽管目前尚未找到一致公认的白血病易感基因，但极低频电磁场对应答基因的表观遗传学影响可能为极低频电磁场对儿童白血病的影响提供更多的佐证。

参考文献

Binhi V. 2008. Do naturally occurring magnetic nanoparticles in the human body mediate increased risk of childhood leukaemia with EMF exposure? Int J Radiat Biol, 84(7): 569～579

Henshaw DL, Ward JP, Matthews JC. 2008. Can disturbances in the atmospheric electric field created by powerline corona ions disrupt melatonin production in the pineal gland? J Pineal Res, 45(4): 341～350

Hug K, Grize L, Seidler A, et al. 2010. Parental occupational exposure to extremely low frequency magnetic fields and childhood cancer: a German case-control study. Am J Epidemiol, 171(1): 27～35

IARC (International Agency for Research on Cancer). 2002. Non-ionizing radiation, part 1: Static and extremely low-frequency (ELF) electric and magnetic fields [EB/OL]. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 80: 1～395

Kavet R, Daigle JP, Zaffanella LE. 2006. Residential magnetic fields, contact voltage and their relationship: the effects of distribution unbalance and residential proximity to a transmission line. Health Phys, 91(6): 592～607

Malagoli C, Fabbi S, Teggi S, et al. 2010. Risk of hematological malignancies associated with magnetic fields exposure from power lines: a case-control study in two municipalities of northern Italy. Environ Health, 30: 9～16

Maslanyj M, Simpson J, Roman E S, et al. 2009. Power frequency magnetic fields and risk of childhood leukaemia: misclassification of exposure from the use of the "distance from power line" exposure surrogate. Bioelectromagnetics, 30(3): 183～188

Mezei G, Spinelli JJ, Wong P, et al. 2008. Assessment of selection bias in the Canadian case-control study of residential magnetic field exposure and childhood leukemia. Am J Epidemiol, 167(12): 1504～1510

Mizoue T, Onoe Y, Moritake H, et al. 2004. Residential proximity to high-voltage power lines and risk of childhood hematological malignancies. J Epidemiol, 14(4): 118～123

撰稿人：曹兆进
中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所

手机电磁辐射对中枢神经系统影响的可能性及其作用机制

The Risks of Dysfunction in the CNS and the Possible Mechanisms of Exposure to Mobile Phone Electromagnetic Fields

1. 背景

据统计，截至2010年7月全球手机用户约达50亿户，中国手机用户约7.8亿户，中国每100人拥有手机58.4部。手机的使用对生活方式带来了全新的变革，它不只是简单的通信工具，近年来还开发了手机DV、拍照、MP3音乐播放、上网、游戏及遥控操纵等众多附加功能；手机不仅成为人们追求的时尚用品，同时也为应急联络等提供了极大的便捷。然而自1993年在美国首次出现手机致癌的诉讼争议之后，手机电磁辐射（880～2145MHz）对健康及环境的影响问题日益引起人们的关注，各国研究机构及世界卫生组织癌症研究机构（IARC）等均投入了大量的人力物力对手机电磁辐射的健康效应进行评估。

2. 科学意义

虽然一些流行病学研究表明低强度手机电磁辐射可能增加阿尔茨海默病、帕金森病、抑郁及脑肿瘤等患病率，可能影响儿童的智商及认知能力，但由于低强度手机电磁辐射对中枢神经系统的影响缺乏一致公认的暴露标志物，而流行病学调查研究又存在一定的偏倚，因而在评估手机电磁辐射对脑组织影响时存在许多不确定性因素，低强度手机电磁辐射对中枢神经系统功能的影响目前仍存在争议。然而如上所述，由于手机电磁辐射暴露人口十分庞大，如果手机电磁辐射对中枢神经系统功能的确存在不良影响，那么届时因手机电磁辐射疾病负担对社会公共卫生资源的冲击将是无法估量的。世界卫生组织（WHO）建议，手机电磁辐射对中枢神经系统影响的危险度评估是现阶段亟须解决的科学难题，尽早阐明手机电磁辐射对脑电生理的干扰机制、揭示手机电磁辐射对脑组织影响的特征性电磁波或效应标志物将为系统研究手机电磁辐射与中枢神经系统的交互作用提供科学依据。

3. 最新进展

手机的工作频率与手机的信号传输类型有关，模拟技术的1G手机的载频频率一般为900MHz，数字技术的2G和3G手机的载频频率包括800MHz、900MHz、1800MHz、1900MHz和2100MHz等频率，手机调制信号的频率则远

小于载频频率（如 10Hz 等），手机信号的传输方式分为连续波和脉冲波。手机信号的复杂性首先为研究手机电磁辐射与生物组织的交互作用机制增加了难度，手机的载频为射频电磁场（100kHz～300GHz），而手机的调制信号则为极低频电磁场（0～100kHz）。目前认为，超过暴露限值的射频电磁场的生物学效应主要是致热效应，而超过暴露限值的极低频电磁场生物学效应主要是诱导生物组织产生感应电场，但手机在使用时手机用户暴露的低强度电磁场作用机制还未阐明。目前认为低强度的手机电磁辐射对中枢神经系统的影响可能与自由基效应、DNA 损伤、血脑屏障的损伤、脑电干扰、特定频率的共振效应、热应激蛋白的表达上调和细胞色素氧化酶活性下调等相关，但低强度手机电磁辐射的非致热效应机制仍存在争议。

4. 主要难点

生物组织对不同频段的电磁场有不同的响应阈值和响应时间，不同频率的手机电磁辐射穿透脑组织的概率和深度不同。手机的射频电磁场与极低频电磁场暴露是否在中枢神经系统具有同一靶点，对某一靶分子的影响、信号转导途径的调控机制等均是非常具有挑战性的难题。

此外，评估脑组织内暴露剂量的比吸收率（specific absorption rate，SAR）是动态变量，SAR 值与手机电磁场的频率、强度，通话时间，手机的摆放位置、方向，辐照对象的年龄、性别、体重、体型、姿势、暴露部位，靶组织的介电常数和电导率等诸多因素相关。目前用于手机 SAR 值剂量的人体模型仅有普通成年人的头部模型和半身模型，而尚没有针对不同年龄、性别、身高和体型的系列标准剂量模型，也没有专门针对特殊生理时期的人群（如孕妇等）的特体剂量模型。由于在手机电磁辐射的内暴露剂量方面存在较大的知识缺口，评估手机电磁辐射对中枢神经系统的作用缺乏可靠的定量评估参数，因而使得手机电磁辐射对中枢神经系统功能影响的危险度评估存在一定的科学不确定性。

而基于时间加权的外暴露剂量也由于不同人的使用方式、通话时手机的摆放位置、平时待机时手机的携带方式、睡眠时手机的开关状态和存放位置的差异、每天使用时间的估计偏倚而存在较大的误差，同时手机的不同制式、不同型号、不同频率和功率也为手机电磁辐射的外暴露剂量估计带来困难。此外，由于某些中枢神经系统疾病（如脑肿瘤、神经官能症、抑郁等）均有一定的遗传倾向，而现阶段手机电磁辐射暴露还没有一致公认的生物标志物，因而很难将手机电磁辐射暴露的生物学效应与遗传因素的作用及其他环境因素暴露的生物学效应进行有效的区分，这也是评估手机电磁辐射对中枢神经系统功能影响的关键难题。

5. 展望

手机的多针重复脉冲频率与人脑电波的频率相似，甄别外源手机电磁辐射刺激信号对内源脑电波的干扰机制可能是揭示手机电磁辐射对中枢神经系统功能影

响的关键证据。在此基础上建立标准化的手机电磁辐射内暴露 SAR 剂量模型和外暴露评估模型将为危险度评估提供科学剂量依据。低强度手机电磁辐射可能对 DNA 不具有直接损伤作用，但其对应答基因的表达调控修饰机制可能成为阐明手机电磁辐射与遗传因素交互作用对中枢神经系统功能影响的重要分子机制。

参考文献

Christ A，Gosselin MC，Christopoulou M，et al. 2010. Age-dependent tissue-specific exposure of cell phone users. Phys Med Biol，55(7)：1767～1783

Christina M Krause，Christian Haarala，Lauri Sillanmaki，et al. 2004. Effects of electromagnetic field emitted by cellular phones on the EEG during an auditory memory task：a double blind replication study. Bioelectromagnetics，25：33～40

Eberhardt JL，Persson BR，Brun AE，et al. 2003. Nerve cell damage in mammalian brain after exposure to microwaves from GSM mobile phones. Environmental Health Perspectives，111：882～883

Hardell L，Carlberg M，Hansson Mild K. 2010. Mobile phone use and the risk for malignant brain tumors：a case-control study on deceased cases and controls. Neuroepidemiology，35(2)：109～114

Johansson A，Nordin S，Heiden M，et al. 2010. Symptoms，personality traits，and stress in people with mobile phone-related symptoms and electromagnetic hypersensitivity. J Psychosom Res，68(1)：37～45

Kaprana AE，Karatzanis AD，Prokopakis EP，et al. 2008. Studying the effects of mobile phone use on the auditory system and the central nervous system：a review of the literature and future directions. Eur Arch Otorhinolaryngol，265(9)：1011～1019

Lahkola A，Auvinen A，Raitanen J，et al. 2007. Mobile phone use and risk of glioma in 5 North European countries. Int J Cancer，120(8)：1769～1775

Schüz J，Böhler E，Schlehofer B，et al. 2006. Cellular phones，cordless phones，and the risks of glioma and meningioma (Interphone Study Group，Germany). Am J Epidemiol，163(6)：512～520

Schüz J，Waldemar G，Olsen JH，et al. 2009. Risks for central nervous system diseases among mobile phone subscribers：a Danish retrospective cohort study. PLoS One，4(2)：e4389

撰稿人：王　强
中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所

气候变暖引起虫媒寄生虫病传播影响的模拟

Modeling the Transmission of Vector-Borne Parasitic Diseases Caused by Global Warming

1. 背景

虫媒寄生虫病是由节肢动物通过叮刺人体皮肤后将寄生虫传入人体内而发病的一类寄生虫病，如疟疾、丝虫病和黑热病等。而广义的虫媒病也包括由媒介生物传播的其他寄生虫病，如血吸虫病、广州管圆线虫病等。

气候变化导致虫媒寄生虫病的传播特点发生变化，主要有直接作用和间接作用之分。但各类虫媒性寄生虫病由于寄生虫的生物学特性、媒介宿主的不同，气候变化对其的影响强度各不相同。如气候变暖对疟疾流行的影响中，直接影响包括温度和降水，间接影响主要包括洪水使按蚊滋生地扩大以及夏季人蚊接触增多等。在血吸虫病方面，钉螺是日本血吸虫唯一的中间宿主，全球气候变暖对血吸虫病传播的影响，主要表现在对钉螺滋生环境和钉螺分布的影响等方面。温度的变暖可直接影响钉螺的生长及日本血吸虫幼虫感染钉螺及其在钉螺体内的发育速度；而温度变暖主要影响钉螺的生存繁殖和感染钉螺中尾蚴的逸出。温度的变暖也可能扩大钉螺在我国的分布范围。在我国大陆钉螺的分布局限于南方的12个省、市、自治区，并且其分布区域的1月份平均气温均在0℃以上。但随着全球气候变暖，钉螺的分布范围（适生区域）是否会发生改变已引起人们的广泛关注。周晓农等（1999）则强调研究全球气候变暖和环境改变对钉螺分布及血吸虫病流行影响的必要性，并开展了全球气候变暖对中国血吸虫病传播影响的系列研究，建立了生物学模型（图1）。此外，国外有研究发现，血吸虫由于生活史依赖于中间宿主，可能比其他蠕虫更易受气候变暖的影响。

而一些虫媒寄生虫病由于媒介扩散速度较快，气候变化可能会引起其传播特性变化速度也较快，可造成流行区范围扩大与传播强度增加、速度加快。如目前的研究发现，我国广州管圆线虫的螺中间宿主——小管福寿螺从20世纪70年代才引入我国，目前已分布于12个省，且传播潜能由北向南逐渐增大。在疟疾传播中，由于气候变暖，按蚊的分布范围将扩大，其结果是疟疾将向拉丁美洲、非洲、亚洲及中东等高纬度地区扩散。气候变暖对疟疾的影响因区域而异，在亚马逊河和美洲中部等因气候变暖而降雨量减少的地区及非洲西部，疟疾传播的风险可能降低，而在非洲东部和南部则相反。研究表明，到2080年，全球疟疾受威

胁人口将达2.6亿～3.2亿；21世纪后半叶，世界上将有45亿～60亿的人口生活在潜在疟疾传播区内。疟疾在我国主要分布于北纬45℃以南的大部分地区，而随着全球气候变暖，原先月平均气温低于16℃的无疟区可能变成疟疾流行区。

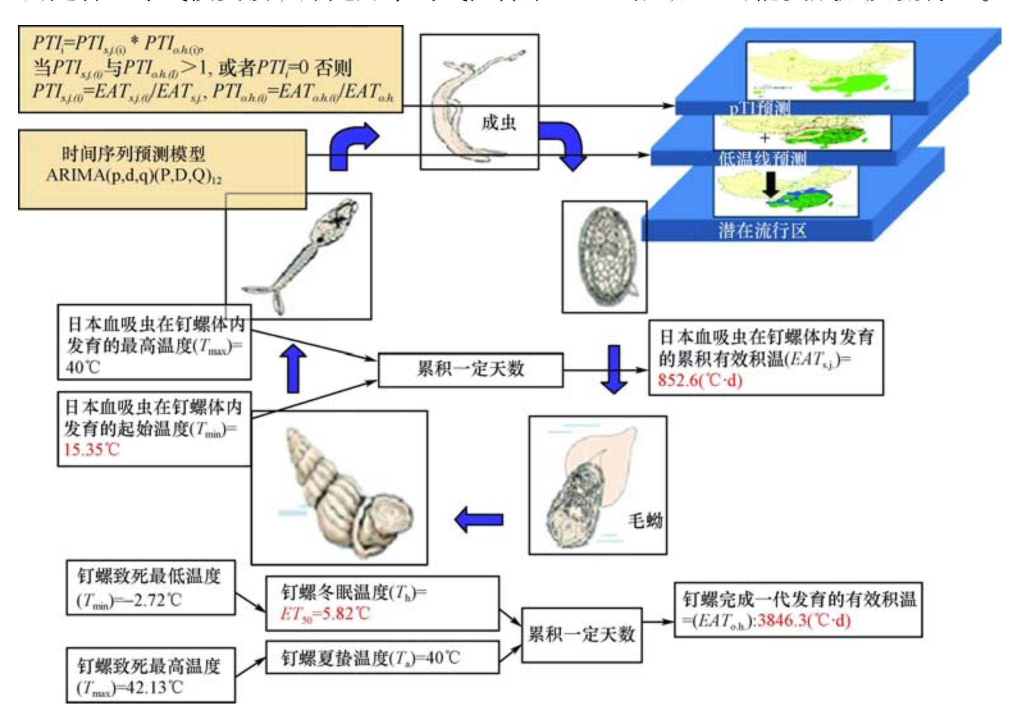


图1 温度对日本血吸虫生活史中各流行环节影响的生物学模型

2. 科学意义

由于节肢动物和软体动物如淡水螺类等在自然环境中传播寄生虫的媒介能量直接受温度、雨量和湿度等气候因子影响，因此，当外界环境出现变暖时，其传播寄生虫病的能量也将发生变化。气候变暖不但可使气温升高，也可造成降雨量的变化。气候变暖后是否可引起虫媒寄生虫病传播能力增强，主要表现在寄生虫病的传播范围和传播强度的变化，但这一传播范围和传播强度的变化趋势尚不清楚。如何根据疟疾、黑热病、血吸虫病等虫媒寄生虫病的传播特征，在构建传播模型的基础上，预测我国不同区域气候变暖不同情景下的虫媒寄生虫病的传播范围与强度的变化规律已成为难题。最近的研究表明，通过模拟各传播环节的参数，从而达到正确预测这一变化规律的发展趋势，对于进一步建立预警与适应性对策、预防和控制虫媒寄生虫病将具有重大的意义。

3. 最新进展

关于气候变暖对疾病传播预测模型的建立等方法学的研究，目前可分为数理

统计学模型和生物驱动模型两种。前者采用数理统计学方法，如 LOGISTIC 多因素回归模型、贝叶斯空间模型等来找出主要决定因子，然后应用建立的模型进行预测；后者则根据生物学实验得出寄生虫或中间宿主的最低或最高发育阈值来预测疾病的流行范围或强度。例如，杨国静等应用贝叶斯时空模型研究气候敏感因子对血吸虫病传播的影响，建立了 3 种模型并比较了不同模型的拟合优度。结果显示，1990～1992 年江苏省血吸虫病空间自相关性显著下降，然后逐渐上升；结果还表明植被指数与日本血吸虫感染呈负相关，地表温度与之呈正相关。相比数理统计学模型而言，生物驱动模型是正在发展中的最新气候-疾病影响评估方法。对生物学模型而言，疾病的主要生物学特点从实验室和现场获得，因而获得有意义的环境参数推断、阈值（如温度）、生物行为、媒介行为、中间宿主和终宿主的行为等，用外推法获得结论。我国学者利用此模型预测了未来气候变暖情境下，日本血吸虫病和广州管圆线虫病的分布。

4. 主要难点

生物学模型也被称为基于过程模型或机械模型，能用于估计环境变暖对生物滋生地的影响。生物驱动模式能用于研究温度与寄生虫-宿主的相互作用。在早期的研究中，生物驱动模型被用来预测气候变暖及其他的人类活动对疟疾等热带寄生虫病分布的影响。而最大的难点是必须通过各种生物学实验研究获得不同寄生虫与其相适应的媒介（或中间宿主）间的生物学相互关系，存在多宿主时，这一相互关系为非线性依赖关系，必须通过数理模型并结合生物学、生态学、社会经济学等多学科的不同方式模拟，以获得最佳参数和最佳模型。因此，如何在完成各项生物学实验研究的基础上，建立生物驱动模型成为模拟气候变化对虫媒寄生虫病传播影响程度的最关键点。

5. 展望

随着气候变化研究的全球升温以及气候变化对人体的影响无可争议的定论，越来越多的研究着重于气候变化对媒介传染性疾病传播趋势的预测。其中气候变化对血吸虫病传播的预测研究目前尚局限于在部分国家中开展。因此，今后需要着重在以下 3 个方面开展研究：在不同情景下的血吸虫病传播范围与强度的预测、各类预测模型参数的校正与验证、模型预测不确定性的分析等。最新的研究方向应该是开发一种新的综合性的生态系统模型，将公共卫生措施、社会经济发展等情景也纳入其中，以提高预测精确性。

参 考 文 献

Lv S，Zhou XN，Zhang Y，et al. 2006. The effect of temperature on the development of *Angiostrongylus cantonensis* (Chen 1935) in *Pomacea canaliculata* (Lamarck 1822). Parasitol Res，99：583～587

Small J, Goetz SJ, Hay SI. 2003. Climatic suitability for malaria transmission in Africa, 1911～1995. Proc Natl Acad Sci USA, 100: 15341～15345

Yang GJ, Vounatsou P, Tanner M, et al. 2006. Remote sensing for predicting potential habitats of *Oncomelania hupensis* in Hongze, Baima and Gaoyou lakes in Jiangsu province, China. Geospat Health, 1: 85～92

Yang GJ, Vounatsou P, Zhou XN, et al. 2005. A potential impact of climate change and water resource development on the transmission of *Schistosoma japonicum* in China. Parassitologia, 47: 127～134

Zhou XN, Yang GJ, Yang K, et al. 2008. Potential impact of climate change on schistosomiasis transmission in China. Am J Trop Med Hyg, 78: 188～194

撰稿人：周晓农[1]　吴忠道[2]

1 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所

2 中山大学

高维生物医学数据分析的新理论、新思路和新方法

High-Dimensional Biomedical Data Analysis：Novel Theory，Strategy and Methods

随着高通量分子生物技术的飞速发展，基因组学、蛋白质组学、转录组学等的研究也取得了长足的发展，同时，大量的高维生物医学数据不断涌现。例如，基于单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism，SNP）的全基因组关联研究（genome-wide association study，GWAS）资料、基于基因表达谱（gene expression pattern）的特征基因选择研究资料、基于蛋白质表达谱（protein expression pattern）的疾病分型研究资料，另外还有研究抗原抗体谱（antigen-antibody profile）、DNA 拷贝数变异（copy number variation，CNV）、DNA 甲基化模式变异（DNA methylation pattern）等类型的资料。这些数据呈现“高维度、小样本”（high dimension and low sample size，HDLS）的特点，即样本含量较小（一般为数十个到数千个），而变量数非常多（一般为数千个到几十万甚至上百万个）。高维数据不但给人们对数据结构的空间想象、形象展示、深刻理解带来了困难，而且给后续统计分析（主要包括差异表达分析、关联分析、判别分类、交互作用等）带来了极大的挑战。

目前，针对这类研究有一些分析方法，主要有三种策略，包括降维/选维策略、惩罚策略和多阶段研究策略。

降维/选维策略：包括主成分降维，偏最小二乘回归降维，或采用机器学习方法（随机森林、支持向量机等）进行选维；或者用对基因、通路的分析代替对单个位点的分析，以减少多重比较的次数，从而提高检验效能。

惩罚策略：在选择变量建立回归模型时，对目标函数进行一些惩罚。例如 Tibshirani 提出的最小绝对值收缩和选择算法（least absolute shrinkage and selection operator，LASSO）和 Efron 等提出的最小角度回归算法（least angle regression algorithm，LARS）。

多阶段策略：采用多阶段的研究设计，循序控制 Ⅰ 类错误，逐步减少变量数。例如，在两阶段全基因组关联研究中，第一阶段研究着重从所有位点中筛选出部分可能与疾病有关的位点，第二阶段则在另外的独立样本中对第一阶段选出的位点进行验证（包括在同种族人群中的验证以及在其他人种中的验证），由此达到控制假阳性、提高检验效能的目的。

目前，这类研究中存在的主要问题和挑战表现为：

(1) 由于维度很高，而样本很小，故数据在高维空间呈现出“稀疏性”，形不成分布，导致难以描述其统计性质；且部分变量间高度相关，伪相关现象也很常见。

(2) 维数灾难（curse of dimensionality）带来很多算法的复杂性增加（通常随维度呈现指数增长）。复杂的统计模型常常表现为参数估计不稳定（instability）、估计误差大、过度拟合（over fitting）、局部收敛（local convergence）；简单的统计模型可能重复性好，但是基于模型的预测并不充分。在变量数大于样本含量时，不存在最优解，传统的选择最优子集的统计方法失效。

(3) 因点与点间距离的差异随着维度的增加而收缩（shrink），故传统的距离算法不能准确表达高维度小样本空间中点与点之间的距离。因此，基于全变量空间的算法之效率严重下降，导致传统的聚类、判别分析无法直接进行。

(4) 差异表达分析或关联分析中，如果每个变量独立分析，则多重比较（multiple comparison）问题显得尤为突出。因重复使用假设检验，故增加了Ⅰ类错误，即假阳性。一般情况下，如果 m 为独立变量的数目，对每个变量进行检验时的水准为 0.05，则总的Ⅰ类错误概率为 $1-(1-0.05)^m$。当 m 很大时，这个概率趋于1。为了控制假阳性，则必须控制每次检验的Ⅰ类错误，常用Bonferroni校正法，即每次检验的水准为 $0.05/m$，但是该方法过于保守。因此，假发现率（false discovery rate，FDR）校正法（Benjamini and Hochberg，1995）及其衍生方法，迄今为止仍备受青睐。但是，即使用FDR校正，检验效能仍然很低。

(5) 由于致病机制的复杂性，故基于单个变量（如位点）的分析显然不能满足实际需要。基于DNA片段、基因、通路的分析，基因-环境交互作用、基因-基因交互作用的分析，特别是高阶相互作用的分析是研究的重点问题。然而，面对几十万个甚至上百万个变量，以及考虑到生物学交互模式的复杂性，目前的计算机系统很难胜任高阶交互作用的探索。例如，在50万个SNP的全基因关联研究中，即使是一阶的SNP-SNP交互作用，有超过 10^{11} 种组合！目前的计算机系统很难胜任。

因此，高维数据分析和信息挖掘亟须新的生物统计学、生物信息学的理论、思路、策略和手段。这些新理论、思路、策略和手段对于从海量数据中锁定遗传易感位点，寻找环境危险因素、预后因子，探索基因-环境交互作用等方法的确立具有重要指导意义。

参考文献

Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. Controlling for false discovery rate: a practical and powerful

approach to multiple testing. Journal of the Royal Statistical Society :Series B ,57 :289～300
Breiman L. 2001. Random forests. Machine Learning ,45(1):5～32
Cutler A ,Stevens JR. 2002. Random forests for microarrays. In:Kimmel A ,Oliver B ,eds. DNA Microarrays ,Part B :Databases and Statistics ,Volume 411(Methods in Enzymology). San Diego ,CA :Academic Press
Efron B. 2004. Large-scale simultaneous hypothesis testing: the choice of a null hypothesis. Journal of the American Statistical Association ,99 :96～104
Li X ,Xu R. 2009. High-Dimensional Data Analysis in Cancer Research. Berlin :Springer
Liu D ,Ghosh D ,Lin X. 2008. Estimation and testing for the effect of a genetic pathway on a disease outcome using logistic kernel machine regression via logistic mixed models. BMC Bioinformatics ,9 :292
Tibshirani R. 1996. Regression shrinkage and selection via the lasso. Journal of the Royal Statistical Society. Series B ,58 :267～288
Wang K ,Li M ,Bucan M. 2007. Pathway-based approaches for analysis of genome-wide association studies. American Journal of Human Genetics ,81 :1278～1283

撰稿人：陈　峰
南京医科大学

如何面对海量临床数据分析处理的挑战

How to Face the Challenge of Massive Clinical Data Processing and Analysis

临床诊疗数据是患者在中、西医门急诊就诊和住院过程中产生的，以临床诊疗活动和结果为内容的各类诊疗记录，包括疾病症状、体征、诊断、病种、术种、实验室、医学影像、电生理、药疗、放疗、介入治疗、手术麻醉、护理、费用、疗效、随访，以及诊疗者和患者人口学等内容的信息集合。近 20 年的统计资料显示，我国诊疗人次每年平均以 1.76% 的速度增长（表 1）。特别是随着医院信息系统的快速发展，这类数据的记录存储得以实时性、时序性、过程化、明细化、网络化，数据内容也日益丰富并随时间的推移持续且快速地增长。这些海量珍贵的临床信息资源无疑是支持临床决策、循证诊疗、疾病预防控制、临床科学研究、政府卫生管理与决策的重要资料。

表 1　1985～2008 年全国医院诊疗人次统计（单位：亿）

年份	诊疗人次	门急诊人次	年份	诊疗人次	门急诊人次	年份	诊疗人次	门急诊人次
1985	12.55	11.37	1993	13.07	12.19	2001	12.50	11.74
1986	13.02	12.18	1994	12.69	11.86	2002	13.08	12.17
1987	14.80	14.00	1995	12.52	11.65	2003	12.82	12.13
1988	14.63	13.76	1996	12.81	11.61	2004	13.81	13.16
1989	14.43	13.52	1997	12.27	11.38	2005	14.74	14.19
1990	14.94	14.05	1998	12.39	11.51	2006	15.64	15.12
1991	15.33	14.40	1999	12.31	11.51	2007	17.46	16.85
1992	15.35	14.31	2000	12.86	11.83	2008	19.08	18.58

资料来源：引自中华人民共和国卫生部《2009 年中国卫生统计年鉴》。

但是，长期以来，由于受到临床诊疗数据自身特征和现有分析方法应用条件的限制，大多数该类数据在应用上只能基于手工模式，通过传统的实（试）验或调查设计的方法获取样本，采用现行的数理统计方法对数据进行分析和推断，而面对临床实际工作中对个案化、全样本包含性分析应用的刚性要求，现行数据获取模式及分析处理方法，很难满足研究者获得完全资料本质特征和规律性的结论。使得目前这些珍贵的海量数据只能得到极有限的利用，大量的明细的临床诊

疗数据仍长期处在闲置浪费状态。

临床大多数诊疗数据的特征表现在：①同病种、术种条件下，相同指标间有着较大变异，极端值和离群点多见；②许多定量指标即使经过变量变换，也很难满足现行统计分析方法所要求的特定分布需求；③大多数指标关联性强，独立性难以保证；④存在着数据缺失现象。因此，几乎不满足目前各类实（试）验或调查设计下统计分析方法对资料分布的需求。

在临床诊疗数据的分析应用需求上，往往也不同于有明确研究目的单一主题的数据分析需求，多数情况下是基于个案化、原始性、时序性、特异性的原始数据，不受统计分布限制、数据极值影响；不受非独立性因素约束以及确定性结果需求的影响。进行多变量间横向、纵向、不同剖面、不同维度的比较分析、关联分析和追踪分析，既要总结不同个体变异的特殊性和特异性，获得各类有价值的个案优化诊疗方案，也期待从中发现资料的本质特征，解释其规律性，以满足临床诊疗的循证支持与疗效优化转换。探索满足上述需求的数据分析处理的有效方法，是长期以来我国医疗领域在临床数据收集和处理上迫切需要解决的疑难问题。

近年来，随着信息模型技术、ODS 技术、数据仓库技术、数据挖掘技术及计算机模拟技术的发展，为海量的网络化临床诊疗数据的快速获取和处理提供了有效的技术手段。此外，用于这类数据分析的新方法研究也多有探索。例如，用于监测的捕获-再捕获方法的研究与应用，用于疾病筛查多阶段 Markov 链随机模型研究，用于非实（试）验研究因果推断需要的虚拟现实模型和因果网络模型以及用于分类研究的决策树、人工神经网络模型的研究等，为统计分析方法的创新和发展也提供了参考。

面对海量临床数据分析处理的挑战，一方面需要探索突破基于既定分布、实（试）验研究的统计假设，研究解决现行临床数据的复杂关系、混杂因素带来偏倚的校正方法，以及个性化、变异性多变量的分类分析与统计推断的新理论、新方法；另一方面需要研究解决网络环境下持续增长日益扩展的临床诊疗数据与数据源的高效分离、全过程时序记录、规范标识、关联存储、重复调用，以及实时性、多层次、多维度的数据挖掘利用。这类方法学的突破，将会使得我国沉睡多年且不断增长的海量临床诊疗数据得到充分有效的利用，进而转化成推动我国科技创新，甚至是国际医学发展的巨大动力。

参 考 文 献

黄彦，田考聪，易东．2006．现代统计方法在蛋白质组信息分析中的应用．中国卫生统计，23(6)：557～558

刘丽华，冯丹，胡凯，等．2009．如何提高医院管理者对 DSS 的利用率．中国医院，13(10)：2～4

刘丽华,周丹,曹秀堂.2008.数字化医院统计工作理论模式与实践.中国医院,12(12):4～7
中华人民共和国卫生部.2009.2009年中国卫生统计年鉴.北京:人民卫生出版社
Christophe C, Efstratios G, Stefan VA, et al. 2007. Machine learning and robust data mining. Computational Statistics & Data Analysis, 52(6):151～154
Elston RC, Thompson EA. 2000. A century of biometrical genetics. Biometrics, 56:659～666
Lee ML, Whitmore GA, Rosner BA. 2010. Threshold regression for survival data with time-varying covariates. Stat Med, 29(7～8):896～905
Melanie H, Alexandros K, Julien P, et al. 2004. Data mining for mass-spectra based diagnosis and biomarker discovery. Drug Discovery Today, 2(9):214～222
Phan JH, Quo CF, Wang MD. 2006. Functional genomics and proteomics in the clinical neurosciences: data mining and bioinformatics. Progress in Brain Research, (158):83～108
Zhou XH, Obuehowski NA. 2002. Statistical Methods in Diagnostic Medicine. New York: John Wiley & Sons

撰稿人:刘丽华　冯　丹
中国人民解放军总医院

如何认识基于全基因组关联分析数据的基因环境交互作用

How to Inference the Interaction Between Gene and Environment Based on Genome-Wide Association Study Data

常见疾病如糖尿病、高血压、肥胖和癌症等受多个基因和环境因素共同影响，每个基因的单独作用较弱，且往往存在多基因交互和基因环境的交互作用。因此，这些疾病又被称为复杂疾病，对其遗传机制的研究有助于开发新药物、发展个性化医疗和开展预防。上述复杂疾病不像单基因疾病，即不遵循经典的Mendel遗传规律，遗传因素对疾病只起部分作用，如遗传因素对老年性痴呆的影响为60%～80%。其发生发展是遗传因素与生活方式环境因素共同作用的结果，往往存在遗传异质性、表型异质性，遗传模式也尚未确定。基于以上特点，复杂疾病的研究面临着众多难题。

随着国际人类基因组计划深入研究，第三代遗传标记单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism，SNP）被广泛应用于复杂疾病致病基因的发掘。早期研究大多集中在少数生物学功能已知的候选基因突变位点上，应用的研究设计主要为经典的病例对照研究，即分别测定病例组和对照组某个位点突变的频率，然后利用统计学方法检验该位点的突变在两组间是否有统计学意义，从而判定该位点所在的基因是否为致病基因。但是这种候选SNP位点所针对的基因数少，限制也较大，对于一些生物功能未知的基因未能全部囊括。随着DNA测序技术的快速发展，从整个基因组范围内查找序列变异，筛选与疾病相关的SNP成为可能，全基因组关联分析（genome-wide association study，GWAS）也应运而生。全基因组关联分析是现阶段研究复杂疾病与基因关系最为有效和方便的一种方法，其不再受候选基因的限制，使得众多生物学意义不明的基因及大量基因间的SNP都为复杂疾病的研究提供了线索，利用的研究设计仍然是经典的基于人群的病例对照研究。从2006年起，已经陆续报道了糖尿病、乳腺癌、前列腺癌、精神分裂症等几十种疾病的关联分析结果，确定了一系列疾病的易感位点。在我国“863”计划中，亦对精神疾病、高血压、糖尿病、肺癌和食管癌等5种重大疾病的全基因组关联分析进行了重点支持。

但是，目前大部分已发表的全基因组关联研究主要聚焦于单个致病基因的发现，对于全基因组范围内的多态位点突变-基因-环境间的交互作用很少考虑。而

如果忽略这种交互作用，会对理解复杂疾病的遗传基础造成偏差，从而造成同一易感位点在不同的研究者、不同的研究人群（种族）中无法得到复制。这里所谓的交互作用指的是统计学意义上的交互作用，它与生物学上的交互作用有一定的区别。对于复杂疾病这种受基因、环境及其交互作用影响的多因子疾病而言，基因-基因、基因-环境间的交互作用研究比单个致病基因的研究显得更有意义，而基于全基因组关联分析的数据特点（变量多样本少、变量间不独立等），对统计学方法提出了更高的要求。

全基因组关联分析的主要数据形式如下：应变量为离散型变量（如健康=0，患病=1等）或连续性变量（如生化检测指标），自变量为基因的分型（如aa=0，Aa=1，AA=2）。单位点基因型可由表1表示。

表1 单位点基因型数据

	aa	Aa	AA	合计
病例组（$y=1$）	m0	m1	m2	m
对照组（$y=0$）	n0	n1	n2	n
合计	s0	s1	s2	s

同样，环境因素也可以根据暴露与否或者暴露量分级成离散变量。因此从数据的形式看，评价基因-基因、基因-环境交互作用可以用传统的Logistic回归模型等，但是其缺点是显而易见的。一是样本量远远小于变量数，造成检验效能的降低，这一点有研究人员提出利用潜变量克服，但是对于潜变量意义的解释往往比较困难；二是由于变量众多，模型的稳健性很差；三是考虑二阶或者更高阶数的交互作用，会使计算负荷急剧增加，从而降低了模型的实用性。因此，有研究在Logistic回归的基础上进行了改进，如惩罚性Logistic回归。但是惩罚性Logistic回归有一前提假设，即因素间交互作用的关系只能为相乘关系。目前被广泛应用的方法是多因子降维（multifactor dimensionality reduction，MDR），MDR为非参数方法，不需要指定遗传模式和交互作用模型，可以识别高阶交互作用等。但是MDR存在着以下缺点：其一是分析交互作用时不考虑主效应；其二是发现交互作用的能力随着研究位点数的降低而减小，对低维交互作用不敏感；其三是对于每个多位点基因型，只能将其分为高风险和低风险，无法获得量化指标。贝叶斯方法在交互作用的研究中也有应用，较为典型的为Wakefield等利用贝叶斯混合模型识别基因-环境和基因-基因间交互作用的研究，在适当的变量个数时取得了很好的效果，减少了假阳性率，但是对于全基因组范围的交互作用识别时，在计算负荷上仍然有很大的改进空间。此外，一些机器学习的方法如支持向量机、随机森林等也被大量应用于交互作用的识别，但是这些方法都难以对选择的变量组做出合理的解释，计算结果只能是从数据到数据，无法对生物学

意义提供有益的依据。

除了上述传统的病例对照设计，也可利用单纯病例研究（case-only study）评价基因和环境的交互作用。这种研究设计能有效地提高检验效能，降低样本量及研究成本。但是也存在缺陷，如只能估计基因-环境交互作用，无法估计各自主效应，容易造成选择偏倚等。

目前生物学实验上没有很好的方法来验证基因-基因间、基因-环境间的交互作用。现有统计学方法和机器学习方法在稳健性、计算负荷、生物学意义解释等方面存在着较大的问题，这些都给复杂疾病的病因学研究带来了困难。鉴于此现状，如何针对全基因组关联数据建立效率和稳健性并重，对因果关系和生物学意义有很好解释的统计学模型成为亟须解决的难题。贝叶斯方法以及在建模过程中整合基因通路等信息可以成为新的研究方向。同时在模型的评价研究过程中，除了利用模拟数据外，处理真实复杂疾病的数据是其主要目的。因此，全基因组关联数据的公共数据库构建在算法的开发过程中亦有重要意义。

参考文献

Abraham R, Moskvina V, Sims R, et al. 2008. A genome-wide association study for late-onset Alzheimer's disease using DNA pooling. BMC Med Genomics, 10: 144

Clayton D, McKeigue PM. 2001. Epidemiological methods for studying genes and environmental factors in complex diseases. Lancet, 358(9290): 1356～1360

Hahn LW, Ritchie MD, Moore JH. 2003. Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene-gene and gene-environment interactions. Bioinformatics, 19(3): 376～382

McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, et al. 2008. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. Nat Rev Genet, 9(5): 356～369

Park MY, Hastie T. 2008. Penalized logistic regression for detecting gene interactions. Biostatistics, 9(1): 30～50

Wakefield J, De Vocht F, Hung RJ. 2010. Bayesian mixture modeling of gene-environment and gene-gene interactions. Genet Epidemiol, 34(1): 16～25

撰稿人：贺　佳
第二军医大学

中西医临床复杂数据分析处理中基础术语集及信息模型的重要性

The Significance of Basic Terminology and Information Model in Clinical Data Processing and Analysis of Integrated Chinese and Western Medicine

如何跨越实验室与临床实际的鸿沟、提高实验室成果向临床实际解决方案的转化效率、进行转化医学研究是当前生物医学研究的一个热点。建立实验室与临床实际的桥梁或从临床实际出发进行疾病治疗的相关研究已显得日益迫切。中医学作为“从临床中来、到临床中去”的以临床医学为基础的学科，以临床实际数据的记录、管理和归纳利用为基础。建立中医临床实际数据的分析利用模式，将极大推动中医学基于临床实际进行研究的能力与水平，形成中医学在临床中进行疾病治疗和诊疗创新的完善体系。

中西医结合诊疗一直是我国中医住院患者治疗的主要模式，且诸多西医医院也逐步结合采用中医学的理念和治疗方法。随着医院电子病历和居民电子健康档案的建立，不同层次临床数据中心的形成，大量临床诊疗信息的涌现，也必将为中西医临床数据的分析提出多方面的需求。

相对其他领域而言，临床信息具有高度的复杂性和语义性特点，建立统一高效的临床数据模型、分析方法与处理规范，在临床信息的要素和关系规范的基础上，形成广泛遵循的概念信息模型和分析模型，是进行大规模临床数据存储管理、数据分析利用与科学研究的基础。因此，研究中西医结合的临床数据模型与分析方法的构建，形成面向科研分析的概念信息模型、物理数据模型指导性框架、相应的数据类型与语义规范等具有重要意义，是我国医学领域亟待解决的科技问题之一。

对临床实际数据的利用分析，从中发现诊疗规律，已经成为医学界的共识。整合临床与实验室数据，是形成临床实际解决方案的有效途径。通过异质数据整合，构建大规模临床数据利用分析平台，进行临床实际诊疗数据的挖掘分析是直接获得实际解决方案知识和诊疗规律，进而消除实验室与临床实际鸿沟的有效方法。而中西医结合临床数据与分析模型的构建是临床信息统一、语义规范和高效分析的基础。因此，中西医结合临床数据与分析模型的构建研究具有重要的科学价值。通过该模型的构建能够支持大规模的数据整合和存储，并实现统一规范的

临床分析数据集标准，高效的分析方法，数据分析处理的规范流程与应用体系，支持临床数据采集过程的质量控制、高效查询展现与分析利用等。

临床数据模型的构建是医学信息学研究的重点之一。在现代医学信息学领域，主要涉及三方面的研究工作。第一，自20世纪60年代以来，医院业务信息系统，如HIS、LIS和PACKS系统等从临床操作流程出发，建立了基于不同数据库管理系统的业务数据物理模型，以支持业务操作和业务信息存储。第二，从临床数据的交互和规范利用的角度，进行了参考信息模型如HL7 RIM的研究。这些相关研究主要从各医疗业务系统的信息交互出发，希望建立标准化的流程性临床数据规范，从而支持各业务系统临床数据的共享。第三，鉴于临床业务（疾病诊疗）主体信息的自然语言特性，解决临床信息的语义和深入利用问题。相关研究人员从术语和临床知识表示的角度，进行了临床术语库和临床知识表示等研究，形成了如SNOMED-CT、GALEN等系统。这些系统从术语的同义、概念关系和语义推理等方面为临床信息的语义化表达和利用提供了基础。

另一方面，临床数据挖掘具有独特性与复杂性，是一个极具挑战的研究课题，需要处理多种医学实体和时序性事件之间的关系。当前的现代医学临床数据挖掘研究多集中在对理化指标的分析利用，而对病历数据中的临床表现如症状、体征等的分析较少。最近，结合中医临床研究和挖掘分析的需求，有研究人员提出了中医临床参考信息模型和临床数据仓库平台，以支持中医临床数据的大规模分析利用。且针对中医文献语义化检索的问题，进行了中医一体化语言系统（UTCMLS）和面向结构化临床数据采集的中医临床术语集的探索和构建，这些研究为建立中西医结合的临床数据模型提供了基础。

从数据内容的角度，可以认为临床诊疗事件是临床诊疗信息的主体构成要素。高质量的中西医结合临床数据分析需要基于临床事件的表示和事件内实体信息的语义规范，即基于关系明晰、语义明确的可分析数据。本科学问题包括如下主要难点：

(1)“症（效）-证（病）-治”临床事件为主体的概念信息模型：建立完整的临床信息如主诉、现病史、既往史、病程记录、诊断和处方治疗等，实现对症（临床表现）与效（临床表现的变化）、证（病）（诊断）和治（治疗措施）等进行分类抽象的模型是一个难点。该模型需要在合适的信息粒度的基础上，实现对各事件之间时间和空间上逻辑关系的准确表达，并涵盖临床术语体系，能够普适地容纳中西医学临床信息。

(2)面向数据分析与数据仓库平台构建的临床基础术语集：为实现临床概念信息模型中各实体信息的规范性和语义统一性，以及支持临床数据仓库平台中大规模临床数据挖掘分析的领域知识整合利用，需要研究建立具有同义词和语义关

联的临床基础术语集。该术语集需要为中西医学信息的整合利用提供规范术语基础。

参考文献

郭玉峰,刘保延,李平,等.2007.知识本体与中医临床术语规范化工作.中华中医药学刊,25(7):1368～1370

Bellazzi R,Zupan B.2008.Predictive data mining in clinical medicine:current issues and guidelines.Int J Med Inform,77(2):81～97

Cios KJ,Moore GW.2002.Uniqueness of medical data mining.Artif Intell Med,26(1～2):1～24

Johnson SB.1996.Generic data modeling for clinical repositories.JAMIA,3:328～339

Marincola FM.2003.Translational medicine:a two way road.J Transl Med,1:1

Reinhold Haux.2006.Hospital information systems-past,present and future.International Journal of Medical Informatics,75:268～281

Roddick JF,Fule P,Graco WJ.2003.Exploratory medical knowledge discovery:experiences and issues.Acm Sigkdd Explor Newslett,5(1):94～99

Zerhouni EA.2005.Translational and clinical science-time for a new vision.N Engl J Med,353(15):1621～1623

Zhou X,Chen S,Liu B,et al.2010.Development of traditional Chinese medicine clinical data warehouse for medical knowledge discovery and decision support.Artificial Intelligence in Medicine,48(2～3):139～152

Zhou X,Wu Z,Yin A,et al.2004.Ontology development for unified traditional Chinese medical language system.Artificial Intelligence in Medicine,32(1):15～27

撰稿人：刘保延[1]　周雪忠[2]

1 中国中医科学院

2 北京交通大学

突发公共卫生事件监测预警

The Surveillance and Early Detection of Public Health Emergency Events

1. 背景

突发公共卫生事件是指突然发生，造成或可能造成社会公众健康严重损害的重大传染病疫情、群体性不明原因疾病、重大食物和职业中毒以及其他严重影响公众健康的事件。我国颁布实施的《传染病防治法》和《突发公共卫生事件应急条例》规定，国家建立传染病和突发公共卫生事件监测预警机制。《中华人民共和国突发事件应对法》也规定“国家建立健全突发事件预警制度”，对于“公共卫生事件即将发生或者发生的可能性增大时”，“发布相应级别的警报”。总体上，突发公共卫生事件监测、预警是指通过收集、整理、分析突发公共卫生事件相关信息资料，评估事件发展趋势与危害程度，在事件发生之前或早期发出警报，以便相关责任部门及事件影响目标人群及时做出反应，预防或减少事件的危害。

2. 科学意义

一套完整、科学、有力的突发公共卫生事件监测体系和预警机制，有助于卫生部门及时采取科学应对措施，预防和减少危害，提高卫生部门处置突发公共卫生事件的综合能力；有助于公众正确对待突发公共卫生事件，恰当地采取自我防护措施，自觉配合专业机构实施预防控制工作；有助于促进事件发生期间社会的稳定，提高政府危机管理水平。

3. 最新进展

科学、完善的监测和报告体系，是突发公共卫生事件预警的基础。突发公共卫生事件监测主要采用疾病监测、症候群监测、病原学监测、医药物品使用情况监测、学校缺课或单位缺勤监测等多种方法。监测信息主要来自于疾病控制、医疗服务、卫生监督等卫生部门，而气象、农业、水利、林业、检疫等部门的信息和大众媒体的信息，也为突发公共卫生事件的早期发现提供了有益线索。2004年以来，我国已建立了突发公共卫生事件报告管理信息系统、疾病监测信息报告管理系统、健康危害因素监测信息系统、全国重点传染病和病媒生物等多个监测系统，有助于监测传染病的人群、时间、空间动态分布，监测病原体的类别、变异、毒力、耐药情况，为了解突发公共卫生事件的发生、发展规律和预警提供了科学依据。

国外突发公共卫生事件预警模型研究工作起步较早。1990 年 4 月，美国疾病预防控制中心以比数图法为数理统计分析方法，以法定传染病监测报告为数据来源，对麻疹、风疹、甲肝等 14 种传染病进行预警。法国、澳大利亚、日本等国家也相继开展了传染病预警研究工作。2000 年起，世界卫生组织相继帮助苏丹、塞尔维亚和摩洛哥等国建立了传染病早期预警系统。在借鉴国外已有预警研究的基础上，我国学者也进行了突发公共卫生事件预警的研究，但主要集中在影响因素比较清楚的传染病方面。目前通常将预警方法分为控制图法、回归模型、时间序列方法和扫描统计量四类，并将建立的模型分为时间模型、空间探测模型、时间-空间探测预警模型等。常见的突发公共卫生事件监测预警流程如图 1 所示。

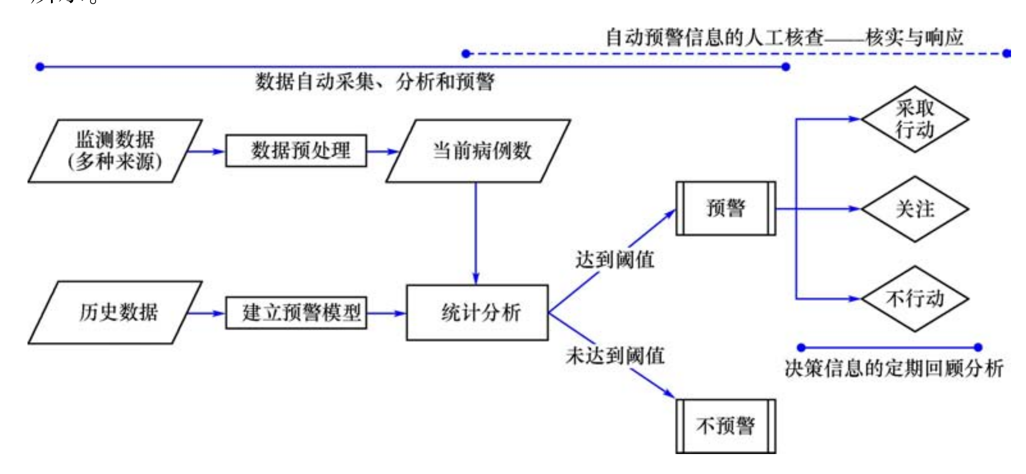


图 1 突发公共卫生事件监测预警流程示意

4. 主要难点

由于不同来源的突发公共卫生事件监测数据均较为独立，如何充分利用并拓展现有卫生应急资源，在不同数据源和监测方法基础上建立一个适合早期发现突发公共卫生事件的监测体系和预警数学模型，促进监测信息的有效利用，进而提升我国突发公共卫生事件预警能力，是当前卫生应急工作中面临的重要科学难题之一。

建立准确、及时的监测预警模型，难点之一在于如何建立适合早期发现突发公共卫生事件的监测体系，实现不同多种数据源信息的共享和综合分析，整合重要传染病监测数据、健康信息数据、自然灾害数据等公共卫生数据库，实现医疗机构、疾病预防控制机构、卫生监督等机构的信息共享，并结合先进遥感技术和地理信息系统技术，提高监测、预警的及时性和准确性。

建立准确、及时的监测预警模型，另外一个难点是如何筛选和建立适宜的预

警方法。目前引入和使用的疾病暴发探测方法，大多数来自于其他领域，如经济学、工业过程控制等。研究结果表明，并非所有的方法都具有很好的准确性和及时性。由于突发公共卫生事件的发生、发展受众多人为和非人为等因素的交错影响，建立有效的预警模型远比工业生产过程控制预警、气候灾害预警系统、沙尘暴预警系统复杂得多。理想的预警模型应当是敏感而特异、科学而简便的，但在实际工作中，往往难以达到平衡，需要根据事件发生、发展规律和影响因素，采用适宜的预警模型和参数。若预警的目标事件发展快、后果严重，应选择更灵敏的预警方法或更低的预警界值；反之，可以选择兼顾灵敏度与特异度的预警方法或预警界值。

5. 展望

凡事预则立、不预则废，随着对人类健康的重视，预防为主的概念已深入人心，监测预警以发现重大健康影响事件为目的，是实现预防为主的有效手段。建立高效的突发公共卫生事件监测体系和预警模型，尚有待在监测体系的建立和整合、预警模型的研究、信息技术的应用等方面做出更多努力，从而最大限度地发挥突发公共事件监测预警的作用，预防或减少事件的危害。

参考文献

金连梅，杨维中. 2008. 我国传染病预警工作研究现况分析. 中国公共卫生，24(7):845～846

卫生部. 2004. 突发公共卫生事件应急条例

杨维中，祖荣强. 2005. 突发公共卫生事件预警. 中华预防医学杂志，39(6):427～429

Buckeridge DL, Okhmatovskaia A, Tu S, et al. 2008. Understanding detection performance in public health surveillance: modeling aberrancy-detection algorithms. J Am Med Inform Assoc, 15(6):760～769

Buckeridge DL, Switzer P, Owens D, et al. 2005. An evaluation model for syndromic surveillance: assessing the performance of a temporal algorithm. Morb Mortal Wkly Rep, 54(Suppl): 109～115

CDC. 1989. Proposed changes in format for presentation of notifiable disease report data. Morb Mortal Wkly Rep, 38(47):805～809

Moore AW, Wagner MM, Aryel RM. 2006. Handbook of Biosurveillance. Amsterdam: Academic Press, 605

撰稿人：赖圣杰[1]　吴　敬[2]　梁万年[2]

1 中国疾病预防控制中心疾病控制应急处理办公室

2 卫生部卫生应急办公室

有效突发公共卫生事件应急综合评估体系的建立难在何处

The Difficulty of Integrated Assessment of Emergency Response for Public Health Events

1. 背景

突发公共卫生事件具有小概率、突发性、危害严重等特点，事件处置过程中科学、快速、规范地综合评估各类危险因素应对的自然科学特点，以及事件处置过程中涉及的法律、伦理、社会、经济等多方面因素，是卫生应急科学决策指挥的前提，是对应急工作的理性判断和高度总结，是突发事件管理工作中的重要环节。早在 1942 年，美国公共卫生服务部副部长贸廷（Mountin）在密苏里州公共卫生协会第 18 次年会发言时，就从国家层面应对第二次世界大战的卫生服务评估问题提出思考，但此后关于突发公共卫生事件应急评估的研究报告不多。

2. 科学意义

建立有效突发公共卫生事件应急综合评估体系，可以准确识别突发公共卫生事件发生发展的各个阶段。在突发公共卫生事件发生前、发生中和发生后都能及时准确得到决策依据，做到在事件发生前有针对性地进行能力储备，事件发生中采取有效的公共卫生应对策略和措施，事件发生后适时改变策略和进行总结，充分利用有限的公共卫生资源，达到最大程度保护和促进公众健康的目的。

3. 最新进展

自 2006 年起美国卫生和人类服务部与美国疾病预防控制中心加强对突发公共卫生事件准备和应对方面数学模型的研究，并在美国疾病预防控制中心成立应急准备模型研究部门。主要采用计算机模拟和基于场景的分析技术（scenario-based analysis），对传染病、自然灾害、环境暴露、气候变化和生物恐怖等威胁公共卫生的事件进行综合评估，为政府和有关方面提供决策的依据。目前已初步形成流感大流行、放射性泄漏和极端热浪天气事件的评估模型，并在各级卫生部门应急准备应用的评估中显示。基于计算机模型的评估有利于更好地发现问题和机遇，整合各类数据资源，提供更加良好的期望产出，使得各有关方面的决策更加正确；并指出基于计算机模型的评估工具将在未来突发公共卫生事件应对和疾病预防的决策方面发挥重要的作用。

我国自 2003 年传染性非典型肺炎疫情发生以后，突发公共卫生事件的准备

和应对能力方面有了显著的提高；但研究结果显示，我国突发公共卫生事件风险识别、评价和缓解能力还很不足（上述能力平均得分 24 分，总分 100 分）。突发公共卫生事件应急综合评估不仅仅考虑自然科学要素，更要结合社会人文方面的因素，这也意味着突发公共卫生事件应急综合评估不能照搬其他国家的经验，更需要与本国具体国情相结合。

4. 主要难点

突发公共卫生事件应急综合评估的困难可能主要有以下四个方面：

（1）确定纳入综合评估的指标：以传染病事件发生发展为例，根据事件对社会影响的大小可分为若干不同阶段。例如，①某种传染病易于发生的环境条件（只限于特殊地点的特殊疾病，尤其是人畜共患病）；②局限暴发；③多地区流行；④社会基础服务供应和应对能力难以承受；⑤全国或地区水平的社会崩溃（social collapse）。在每个阶段，都有直接的和间接的表现，直接表现例如疾病暴发/流行表现出来的特征，包括发病数、死亡数、传播范围等；间接表现如社会民众恐慌、经济发展受限等。除了疾病流行规律等自然科学要素，有很多法律、伦理、经济等社会人文因素，哪些指标应当纳入评估，在不同国家/地区、不同宗教信仰等情况下不尽相同。如何保证纳入能够完整反映事件全貌的评估指标，是突发公共卫生事件应急综合评估的首要问题。

（2）确定各指标权重：综合评估即对纳入评估各种指标标准化后，赋予不同权重，最后得到综合评分值再加以评估。而各个指标的权重也是突发公共卫生事件应急综合评估的一个核心关键问题。赋予某个指标多大的权重，将决定最终评估结果。在突发公共卫生事件发生早期，尤其针对病因不明的事件，很多时候是靠专家法来确定各个指标权重。这个过程则必须认真考虑参与评估的人选，因为不同背景的人对同一种事物的风险判断很可能存在极大的不同，必须全面权衡各种利弊。

（3）准确数据的获取：在突发公共卫生事件发生的早期，情况相对紧急，很多现场数据难以获取，或者获取得到的信息有限，这就很容易导致对事件发展的错误评估。以 2009 年甲型 H1N1 流感大流行为例，早期诊断试剂有限，发现病例以重症病例为主。因此在 2009 年 4 月 26 日时初步计算“病死率”高达 18.42%，而在 2009 年 6 月 19 日时“病死率”才 0.41%，此期间病毒未发生重大变异。基于上述两个数据结果进行决策，会得到截然不同的疾病预防控制策略。如何保证数据来源准确可靠，也是突发公共卫生事件应急综合评估的一个重要难题。

（4）突发公共卫生事件种类多，需要相应的综合评估模型：根据《国家突发公共事件总体应急预案》规定，突发公共卫生事件主要包括传染病疫情、群体性不明原因疾病、食品安全和职业危害、动物疫情，以及其他严重影响公众健康和

生命安全的事件。上述不同种类事件的发生、发展规律不尽相同，需要有针对性的评估方法。

参考文献

胡国清，饶克勤，孙振球. 2007. 我国突发公共卫生事件风险识别、评价和缓解能力的现状. 中国医学科学院学报，(4)：548～550

涂文校，陈园生，卢亮平，等. 2009. 2009年甲型H1N1流感主要流行病学特征. 疾病监测，(12)：906～909，914

Mountin JW. 1942. Evaluation of health services in a national emergency. Am J Public Health Nations Health，32(10)：1125～1130

Rosenfeld LA，Fox CE，Kerr D，et al. 2009. Use of computer modeling for emergency preparedness functions by local and state health officials：a needs assessment. J Public Health Manag Pract，15(2)：96～104

Wilson JMT，Polyak MG，Blake JW，et al. 2008. A heuristic indication and warning staging model for detection and assessment of biological events. J Am Med Inform Assoc，15(2)：158～171

撰稿人：涂文校[1]　吴　敬[2]　梁万年[2]
1 中国疾病预防控制中心疾病控制与应急处理办公室
2 卫生部卫生应急办公室

建立突发公共卫生事件的人群心理应急反应模型

Develop the Psychological Response Model for the Public Experiencing Public Health Emergency

1. 背景

突发公共卫生事件由于其突然性和人们的紧张性，在直接导致人员伤亡的同时，还会使人们在体验后受到身体、心理、精神等方面的严重损伤。面对重大灾难时，个体的心理防御机制会显得苍白无力，失去控制事件的能力，从而出现一系列心理反应，主要表现在情绪、认知和行为上。灾难对人的心理冲击不仅表现为急性的心理反应，也可能造成长期的心理影响和深层的信念波动。危机情绪体验与心理反应一般会持续数天到数周，有些甚至影响个人至数月、数年乃至终生。创伤后应激障碍就是突发事件所导致的长期心理创伤，常于灾难发生后数月或数年发生，发生率为18.8%～59%，致残性较高。心理危机是人对灾难这种不正常现象的正常反应，在一定意义上可以说是灾难的自然产物和必然后果，也是灾难暴发后普遍存在的一种现象。世界卫生组织专家断言，没有任何一种灾难像心理危机那样给人们带来持续而深刻的痛苦。突发公共事件导致的公众心理恐慌和心理危机，还会引起相关的次生、衍生突发公共事件，进一步恶化原来的不良局势，甚至影响国家安全、社会稳定和经济发展。

2. 科学意义

心理危机干预指对处在心理危机状态下的个人采取明确有效的措施，告知其如何应用较好的方法处理应激事件，并采取支持性治疗帮助个体度过危机，重新适应生活。心理危机干预的主要目的是：避免自伤或伤及他人，恢复心理平衡与动力，对未来可能遇到的突发事件有更好的应对策略和手段。有效的心理危机干预就是帮助人们获得生理心理上的安全感，缓解乃至稳定由危机引发的强烈的恐惧、震惊或悲伤等情绪，恢复心理的平衡状态，对自己近期的生活有所调整，并学习到应对危机有效的策略与健康的行为，增进心理健康。心理危机受主客观等多种因素的影响，并且随着突发事件的进展和时间的推移分为不同的发展阶段。对公众进行心理应急反应测量和评估，在分析主客观因素和心理反应阶段的基础上建立一个能够测量人群经历突发公共事件心理应急变化规律的预测模型。对于制定有针对性的干预策略，合理配置资源具有重大的指导意义。

3. 最新进展

心理学研究发现，人们对危机的心理反应通常经历四个不同的阶段：首先是冲击期，发生在危机事件发生后不久或当时，感到震惊、恐慌、不知所措。其次是防御期，表现为想恢复心理上的平衡，控制焦虑和情绪紊乱，恢复受到损害的认识功能；但不知如何做，会出现否认、合理化等。再次是解决期，积极采取各种方法接受现实，寻求各种资源努力设法解决问题；焦虑减轻，自信增加，社会功能恢复。最后是成长期，经历了危机变得更成熟，获得应对危机的技巧；但也有很多人消极应对而出现种种心理不健康的行为。美国加州大学心理学教授 Krist Kanel 提出，心理危机包括三个部分：一是危机事件的发生；二是对危机事件的感知导致心理危机当事人的痛苦；三是惯常的应对方式失败，导致当事人的心理、情感和行为方面的功能水平较突发事件发生前降低。心理危机的严重程度受主客观两方面因素的影响。客观因素包括危机的严重程度、人们对危机的了解程度、政府信息的透明度及人们在灾难过程中充当的角色等（如亲历灾难的幸存者、灾难现场的目击者、幸存者和目击者的亲人、后方救援人员、灾难发生后在灾区开展服务的人员或志愿者等）。主观因素主要指人们的心理素质和应对方式。

4. 主要难点

由于突发公共卫生事件中人群的心理反应受主、客观因素和心理反应阶段的交错影响，而个体的主观因素差异较大，不同性质、不同严重程度事件的心理反应阶段进展有很大不同，在实际工作中，难以测量得出客观量化的数据。同时，由于突发公共卫生事件的心理危机干预工作具有很强的时效性，如果通过复杂的测量方法获得相对可信的数据，则可能耗费大量的时间和人力，错过事件后心理危机干预的最佳时机。而如果各种影响因素不能客观地量化，又很难得出具有指导性意义的结论，可能会导致相关投入的不足或浪费。但如何科学测量人群经历突发公共卫生事件的心理应急变化规律，构建人群心理应急变化预测模型，尚有待于找出影响心理反应的主要因素，并采取较为客观、量化的指标来对这些因素进行科学的衡量。

参考文献

傅小玲．2005. 解放军小汤山医院患者及一线医护人员心理干预模式研究．军医进修学校硕士论文

黄悦勤．2003. 灾难时期的社区心理干预．中华全科医师杂志，2(5)：270～272

姚玉红．2008. 地震灾后心理危机干预．现代预防医学，35(12)：2403～2404

张理义，陈春霞，徐志熊．2008. 地震灾后的心理危机干预．人民军医，51(7)：411～412

Belik SL，Cox BJ，Stein MB，et al. 2007. Traumatic events and suicidal behavior：results from a

national mental health survey. Nerv Ment Dis,195(4):342～349

Everly GS,Jrlannery RB,Eyler V. 2001. Sufficiency analysis of an Integrated multicomponent approach to crisis intervention:critical incident stress management. Advances in Mind-Body Medicine,17:174～178

Joseph A,Richard E,Edna B,et al. 2006. A propensity score analysis of brief worksite crisis interventions after the world trade center disaster:implications for intervention and research. Med Care,44(5):454～462

Kristi Kanel. 2003. A Guide to Crisis Intervention. California:Marcus Boggs

撰稿人：陈国永[1]　吴　敬[2]　梁万年[2]

1 中国健康教育中心

2 卫生部卫生应急办公室

绩效管理与公立医疗机构激励机制

Performance Management and Incentives of Public Hospitals

无论是从卫生资源配置还是从医疗服务提供的角度，公立医疗机构都是医疗服务体系的重要组成部分。公立医疗机构应该提供满足居民需要和需求的安全、优质、价格合理及便捷的医疗服务，并按照政府要求承担相关公共卫生服务和社会责任，这也是政府举办公立医疗机构的目的。但是，目前在公立医疗机构资源配置和提供服务方面存在着很多问题，包括：在考虑经济利益的前提下有选择地提供服务（如倾向于少提供传染科、儿科、精神科等可能导致医院亏本的服务）、过度提供服务和提供不必要的服务、倾向于选择提供高价格的服务；医疗安全和质量存在隐患、服务质量有待改善；缺乏控制成本的动力，依靠高投入拉动高收入，医疗资源配置不合理，资源利用效率有待提高；倾向于少承担社会责任等。造成这些问题的一个主要原因是，对医院缺乏有效的激励和约束机制，医院的运行机制在导向上出现了偏差，结果医院的发展偏离了政府举办公立医疗机构的目的和社会目标，社会成本加大。

对公立医疗机构的激励首先涉及市场激励和政府激励的选择问题。改革开放以来，政府对公立医疗机构主要采取了放权以及主要依靠提供各类医疗服务获得收入的补偿机制等改革，调动了公立医疗机构提供服务的积极性，在政府投入没有大幅度增加的情况下，大部分地区城乡医疗资源短缺问题得到基本解决。但是，由于价格结构不合理、顺加作价的药品价格政策、按项目付费的医保政策以及药品虚高定价、在监管缺失的医药要素市场中的不规范竞争（回扣泛滥）等，导致公立医疗机构在缺乏有效约束的情况下，出现了过度提供服务等一系列问题。有学者提出这些问题的产生主要是市场化带来的结果，过度市场化导致了“看病贵”；也有学者认为是政府投入不足、医院不得不追求经济利益所致，只要政府能够保证投入，就能够保证公立医疗机构公益性的回归。但是，也存在与之不同的观点：一是“我们要辩论的问题不是市场化好不好、该不该，而是究竟中国的医疗服务是不是已经实现了市场化”，“看病贵并非缘于市场化”。二是市场机制调节医疗资源配置带来一些问题，主要是因为市场机制有效发挥的条件不具备，而政府的责任缺位或不完全到位是主要原因，并非是市场机制本身的原因。此外，政府过度干预或干预不当影响到市场机制作用的发挥也是导致中国“畸形的市场化”的原因。三是即使政府财政全包，但如果没有有效的激励机制相配

套，可能会导致医护人员积极性下降，反而影响到给患者提供医疗服务的水平和质量，老百姓的利益没有实现，公益性的目标并没有达到。因此，在公立医疗机构激励机制上，政府作用与市场机制作用的关系是在理论上和在操作层面需要研究和解决的关键问题。

在此基础上，又引出另一个需要讨论的问题：政府对公立医疗机构的干预力度应该多大？政府应该采用什么方式和手段、在哪些方面对公立医疗机构进行干预？既往，由于政府对公立医疗机构缺乏有效干预，带来了诸多问题。但从目前很多地区的情况看，政府干预过多也带来很多问题，包括医疗机构缺乏有效提供服务的积极性，出现推诿患者、服务质量和服务水平不高、资源利用效率不高、政府管理成本明显加大等问题。之所以出现此类问题，关键原因之一是对问题产生的原因缺乏清晰的认识，即没有界定清楚政府和公立医疗机构院长的责权。长期以来，政府主要通过行政手段管理公立医疗机构，“所有者”职责基本缺位。政府在很大程度上“放弃”了“所有者”的权力，对医院发展、资源配置和利润使用等重大决策以及资产监管等方面基本处于“放任”状态，医院院长既拥有“所有者”的权力也拥有经营权，且权力的使用缺乏制衡。但因此而出现问题后，政府又将很多公立医疗机构院长本应该拥有的责权过度“上收”，结果带来了新的问题。

对于公立医院来说，无论是过度提供服务、有选择的提供服务，还是缺乏提供服务的积极性、提供效率降低，都偏离了政府举办公立医疗机构的目的和目标。但是到目前为止，在我国尚未找到一种适合国情的、具有可操作性的方法，无论是在理论上还是在实际操作上，仍然在探索之中。一方面，相关理论研究滞后，难以成为制定有效政策的基础，也难以有效指导实践；另一方面，该问题并非是依靠建立一套绩效考核指标体系就能够解决的，涉及政府责权和院长职权的划分以及相关职责如何落实到位等很多问题，而中国的国情既独特又复杂。如何对公立医疗机构建立有效的绩效管理方式和有效的激励与约束机制，使医疗行为完全出于医学目的而不受或少受各种外部因素的干扰是需要解决的难点问题。

参考文献

国务院发展研究中心课题组.2005.对中国医疗卫生体制改革的评价与建议(概要与重点).见:中华人民共和国国务院发展研究中心(社会发展研究部).中国发展评论(中文版),7(Suppl 1)

吴明.2007.我国医疗卫生领域的市场化程度分析.中国卫生经济,(8):5

撰稿人：吴　明
北京大学

符合中国国情/特色的卫生管理体制

Health Administration System Adapting to the State System and the Characteristics of China

促进国民健康改善的有效途径是根据人群的健康需要综合提供预防、保健、医疗、康复等卫生服务，同时将基本医疗保障、基本药物供应、免费基本公共卫生等作为提高卫生服务可及性的保障。这就要求公共卫生和医疗服务提供以及医疗保障、药品供应等多个系统形成一个有机整体以达到综合健康管理的目的。相应地，卫生管理体制也应适应这种综合健康管理的需要。但是，我国目前在卫生管理体制方面存在着亟待解决的问题。

一是卫生管理职能分割，成为推进医疗卫生体制改革以及通过综合健康管理促进国民健康改善的最大体制障碍。目前卫生管理职能分散在多个部门。在投入和资源配置方面，卫生、财政、组织、人事、社保等部门多头负责；在监管方面，卫生、药监、物价、工商、质监、劳动等部门各有职能，形成了“多龙治水”的局面。从我国行政管理体制的设计上看，政府各个部门应该是平等协作关系，各部门相互配合以履行政府的总体职能和实现政府目标。如果确实能够如此，卫生管理职能分散给多个政府部门并不会影响到医疗卫生体制改革以及综合健康管理的效果。但是我国的实际情况并非如此。首先，不同部门的组织目标和关注的重点有所不同，甚至存在着利益上的不一致。各部门通常从本部门的角度考虑问题，站在本部门的立场进行决策和向政府争取权力和资源。结果导致政府目标分离、政府部门各自为政、管理上相互脱节，政府总体目标的实现受到影响。其次，目前各部门和各级政府在卫生管理上的部分责权不清，如公共卫生投入、公立医院出资人职责、医疗保障的职责等，结果导致卫生管理职责在不同部门之间存在着交叉、重叠和空白，在管理上的越位、错位与缺位并存。有利于本部门的事情都争相扩大管理范围和要权力，而在一些方面却存在着管理上的空白，多个部门管理的结果是无人管理。再次，我国目前的管理体制、干部评估与选拔机制以及情法结合处理社会经济事务的文化特点等因素，并非有利于政府部门间的有效协调与合作。各部门之间缺乏有效的沟通和合作，部分卫生改革推进缓慢、卫生管理成本较大但效果不明显，甚至多部门合作的结果只能导致出台的卫生政策成为缺乏系统设计的、部门间妥协的产物，而并非多部门合作共同实现政府目标。总之，上述种种原因造成改善居民健康所必需的公共卫生服务、医疗

服务、医疗保障及药品供应保障等系统之间的天然联系被割裂，导致对国民健康负主要责任的卫生行政部门却无法协调相关职责，部分政府卫生责任难以落实，一些卫生改革难以同步推进，卫生全行业管理难以实现。结果不仅影响到近期医改方案的落实，从长期来看必然会影响到综合健康管理的效果和效率。

二是中国目前的行政管理体制和财政体制是一种“分权”体制。由地方政府协调相关职能部门和财力进行综合管理效率较高，因为地方政府最了解辖区居民的各类需要，并能够对其做出及时反应，可提高资源配置效率，增加了政策灵活性，调整难度相对小，这也是分权的目的所在。但是一方面由于卫生的性质与特点决定了卫生投入在短期内绩效不明显，是难以出政绩的“产品”，往往被政府所忽视；另一方面由于中国各地区发展不平衡，分级财政体制导致最需要政府卫生投入的地方反而因财力不强往往投入严重不足，而且是按照户籍人口的数量和需要配置卫生资源，再加上目前政府卫生相关部门之间缺乏有效沟通、协调和合作，而我国目前的管理体制、干部评估与选拔机制以及情法结合处理社会经济事务的文化特点等因素，并非有利于政府部门间的有效协调与合作，卫生部门处于“弱势”地位，这些都对卫生工作和卫生改革的推进产生严重影响。

因此，如何在现有的管理体制和财政体制下找到有利于卫生发展的途径和方法是亟须解决的问题。对该问题开展研究需要利用公共管理学、政府经济学及政治学等学科的基本理论和方法。在我国，卫生经济学、卫生管理学、卫生法学等学科近年来日益受到重视，发展相对较快。在此背景下，长期以来我国的卫生政策研究也主要以卫生经济学、卫生管理学、卫生统计学等学科为作为支撑。尽管在很多卫生政策研究中涉及管理体制等问题，但主要是从政府经济学和公共管理学的角度，较少涉及政治学理论和方法，也较少综合利用经济学、管理学、政治学等多学科的理论和方法开展研究。因此，多数研究缺乏深度和系统性，难以达到寻求有效解决问题的途径和方法的目的。这与在中国卫生政治学学科起步较晚，缺乏对卫生政治学的系统研究有关。北京大学公共卫生学院是我国目前唯一开设卫生政治学课程的院校，但也仅从 2005 年开始设置。卫生政治学理论研究以及应用卫生政治学理论开展卫生政策研究在我国也刚刚起步。

综上，缺乏有效的理论体系支撑，成为开展符合中国国情/特色卫生管理体制研究的难点之一。此外，中国的政治体制、管理体制及中国的文化具有独特性。因此，国外的行之有效的模式和解决问题的方法并不能够简单移植到中国。研究中国的卫生管理体制，没有现成的模式和方法可以完全照搬，只能立足于中国的实际开展相关研究。这不仅需要掌握相关理论并综合运用，同时要对中国的政治体制、管理体制及中国的文化有深度的理解和深刻理解。这对在此方面开展工作的研究者是一个很大的挑战，这是难点之二。

参考文献

浦兴祖.2006.当代中国政治制度.上海:复旦大学出版社
吴明.2008.我国卫生决策和政策实施的政治环境分析.中国卫生政策研究,1(1):54
杨光斌.2003.中国政府与政治导论.北京:中国人民大学出版社

撰稿人:吴　明
北京大学

医院感染控制与抗菌药物合理应用的管理

Nosocomial Infection Control and the Management of Antibiotics Reasonable Use

预防与控制医院感染是保障医疗安全的一项非常重要的工作，医院感染不仅关系到患者安全，也关系到医务人员的健康。世界各国都存在医院感染问题，2006年，世界患者安全联盟在报告中指出：全球每年有数以亿计的患者由于接受医疗服务时发生感染而使其治疗、护理变得更加复杂，导致有些患者病情加重，不得不延长住院时间；有些患者出现长期残疾；还有些患者因此而死亡。医院感染已成为影响患者安全、医疗质量和增加医疗费用的重要原因，也是高新医疗技术开展的主要障碍之一。因此我们必须采取有效措施，预防和控制医院感染的发生，而抗菌药物合理应用的管理是防控医院感染的最有效措施之一，成为各国政府、医院管理者和广大医务人员的一致共识，并受到高度关注。

但是，抗菌药物不合理应用的现象在全球非常普遍，尤其是发展中国家，我国也不例外。据全国医院感染监测系统的调查表明，我国抗菌药物的应用率为60%～80%，较WHO在全球调查的抗菌药物使用率（30%）高出很多，而且基层医院使用率更高（90%以上）。如此高的使用率，必定存在不合理应用甚至滥用，包括无指征用药、预防性泛用和应用时间过长等。产生的直接后果是耐药菌的产生、医院感染（即二重感染）及卫生资源的极大浪费，尤其是多重耐药菌如多重耐药的结核菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）、泛耐药的鲍曼不动杆菌、产超广谱β-内酰胺酶（ESBLs）的革兰阴性杆菌等的感染，给临床患者的救治带来很大困难。如2006～2007年全国细菌耐药监测网监测资料显示，我国MRSA的检出率已高达56%，ESBLs的大肠埃希菌的检出率为35%，而新抗菌药物的开发远远跟不上细菌耐药性产生的速度。因此抗菌药物的不合理应用直接威胁着患者的安全，甚至影响到整个社会的安全和稳定。

国际上开展抗菌药物合理应用的管理工作比较早，也卓有成效。抗菌药物的使用率逐年下降，耐药菌感染尤其是多重耐药菌感染得到有效控制，也有一些较为成功的经验可以借鉴。但是我国抗菌药物的管理，政府虽然高度重视，颁布了《抗菌药物临床应用原则》和控制多重耐药菌感染的有关文件，在卫生部《医院感染管理办法》中也强调该项工作，抗菌药物合理应用的管理依然面临着许多困难和挑战，主要包括：

（1）如何改变临床医务人员抗菌药物合理应用的意识、使用的习惯，包括治疗性应用、围手术期应用和预防性应用。

（2）如何将抗菌药物合理应用的管理政策与现行的医改政策紧密结合起来，如与当前推行的临床路径的实施结合起来，改变医院管理者对抗菌药物合理应用管理的意识与紧迫性。

（3）采取何种策略，加强非医疗机构如药店抗菌药物应用的管理，控制医院外抗菌药物的应用。

（4）如何改变患者对抗菌药物应用的需求和观念，如感冒、发热都要用抗菌药物，抗菌药物越新、越贵、越广谱越好，静脉使用抗菌药物就比口服的好。应采取何种措施有效降低百姓对抗菌药物的依赖。

（5）采取何种策略、如何建立抗菌药物合理应用的大环境。因为抗菌药物合理应用不仅是医院、医疗领域、医务人员的事，也涉及农业、林业、畜牧养殖业等。对这些领域抗菌药物合理应用的管理，与医疗领域抗菌药物合理应用的管理同等重要。

（6）采取何种策略，加强耐药菌尤其是多重耐药菌的监测与控制。可借鉴国际上发达国家尤其是欧洲的经验，结合我国的实际情况采取有效的综合措施，因耐药菌的监测与控制涉及诸多部门、不同方面、多个学科，以达到预期的目的。

总之，研究影响抗菌药物合理应用的因素、采取怎样的干预措施、重点干预哪些环节，才能有效降低抗菌药物在临床上的使用，是我们亟待解决的问题。同时通过研究与探索控制多重耐药菌感染及其传播，提高抗菌药物使用的有效性，是当前预防和控制医院感染与抗菌药物合理应用管理的一把双刃剑。

参考文献

陈柳勤，孙诚，张莉艳，等．2009．238 株鲍曼不动杆菌感染状况及耐药性分析．实用医学杂志，25(16)：2768～2771

林艳荣，许丁空，王祖恩．2008．南宁市住院结核病患者耐药情况分析．现代预防医学，35(23)：4686～4688

汪复，朱德妹，胡付品，等．2009．2008 年中国 CHINET 细菌耐药性监测．中国感染与化疗杂志，9(5)：321～329

王娜，吴纪宁，马金秋．2009．我院 263 例住院患者抗菌药物合理应用调查分析．中国医院药学杂志，29(21)：1876～1878

赵喜荣，王瑞，连坡，等．2010．1170 例住院患者抗菌药物使用情况分析．中国医院用药评价与分析，10(5)：419～421

郑沁，赖怡，康梅，等．2008．华西医院重症监护病房连续两年院内感染革兰阴性杆菌的耐药性监测．中国抗生素杂志，33(1)：20～25

Didier Pittet，Benedetta Allegranzi，Julie Storr，et al. 2006. Clean care is safer care：the global pa-

tient safety challenge 2005～2006. International Journal of Infectious Diseases, 10: 419～424

Robert C, Owens Jr. 2008. Antimicrobial stewardship: concepts and strategies in the 21st century. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 61: 110～128

Tom Timmerman, Jeroen Dewulf, Boudewijn Catry, et al. 2006. Quantification and evaluation of antimicrobial drug use in group treatments for fattening pigs in Belgium. Preventive Veterinary Medicine, 74: 251～263

撰稿人：李六亿
北京大学第一医院

疾病预防控制体系的绩效评价

Performance Appraisal of Disease Control and Prevention System

履行公共服务职能成为现代政府的显著特征，提高工作绩效亦是现代政府管理的核心问题。疾病预防控制体系为整个社会群体提供公共产品，其服务的对象是社会公众，承担的职能是公共服务，提供的是纯公共服务或准公共服务。因此，作为政府公共服务的重要内容之一，其绩效状况成为政府与社会关注的重点，也应体现在政府绩效评价的范围之中。然而，现阶段我国疾病预防控制机构公共产品的提供效率并不容乐观，投入产出分析发现，各级机构提供公共产品的效率仅为有经济收益服务的七分之一，“重有偿服务、轻无偿服务”现象突出。如何客观、准确地评价我国疾病预防控制工作的绩效，如何能够确保提供优质和高效的公共卫生服务成为一个重要命题。

绩效评价是指在实现目标或完成职能的过程中，依据可量化的指标对工作过程、结果、效率等各方面进行的评价。它起源于20世纪初的企业管理；20世纪50年代开始，美国、英国等国家先后将绩效评价与管理的理念运用到政府及其政府公共部门。在卫生领域，世界卫生组织2000年第一次提出了三项总体目标方面的绩效评价指标：健康状况的改进度、人群期望的反应性和卫生筹资的公平性；初级卫生保健评价标准、健康城市评价等概念、目标和评价指标的提出也在世界各国间产生了重大的影响，促进了卫生系统绩效的提高；而在我国，卫生系统开展的诸多绩效评价研究和实践主要集中于医疗领域，而对于公共卫生领域，尤其是疾病预防控制体系的绩效评价工作很少，缺乏深入而系统的研究。因此，如何集成系列国内外其他领域成熟的理论与方法，紧密结合我国疾病预防控制体系的特点，以体系承担的职能目标为导向，从理论和数学模型构建两个层次，研制系统评价体系绩效的因素和指标体系、体系目标优化控制结点及因素，以及体系绩效持续改进机制等，如何探讨满足体系实践要求的系统评价与持续改进优化策略是一个科学难题。

众所周知，疾病预防控制体系通过社会有组织的努力来预防疾病，延长寿命和促进健康。体系构成繁杂，服务功能覆盖面广，涵盖传染病预防控制、慢性病预防控制、突发公共卫生事件应急处置、健康危害因素监测等。服务过程所涉及的部门或机构众多，包括妇幼保健、卫生监督等其他公共卫生机构、环境保护部、劳动与社会保障部等其他政府部门、各级各类医疗保健服务提供体系，以及

媒体、社区、学术机构、社会公众等非卫生机构和个人。提供服务的机构纵向上层级众多，包括国家、省（自治区、直辖市）、地（市）、县（区）和社区（基层）五个层级，常常被描述为具有不同作用、相互关联和相互作用的网络。面临如此繁杂的体系构成，以体系目标为导向，如何科学、客观设计反映疾病预防控制体系运作规律的理论模型，如系统全面和重点突出的体系绩效评价框架和维度的设计，评价指标的系统收集与筛选，绩效控制关键节点的明确等，是研究中首要解决的关键技术之一。

在理论模型研制基础上，需要从绩效评价指标及其权重、综合评价、关键控制点的理想现实差距等，将理论模型予以定量表达，实现体系的量化综合评价与诊断。由于疾病预防控制体系的繁杂性，决定了其包含信息的多样性，如随机信息、模糊信息、灰色信息及未确知信息等。这就要求针对不同的数据信息灵活采取不同的数据处理方法，尤其是未确知信息的处理方法。众所周知，随机理论、模糊集理论和区间分析等是不确定性理论研究中的常用方法，但如何结合专业特色、针对不同的数据选用不同的处理方法，创新性尝试不确定性理论与方法的耦合，尝试随机模糊耦合、随机灰色耦合、模糊灰色耦合等来描述疾病预防控制体系中的不确定性信息，也将成为一个关键难题之一。在数据处理技术解决的基础上，尚需运用大量现实数据进行理论和数学模型的模拟验证，科学回答模型的信度和效度。

当然，评价终极目标是促进体系的发展，追求绩效最优，实现体系目标的优化。现实中的中国疾病预防控制体系处于非合作状态，作为体系的管理方和组织方（政府）追求的目标是体系投入最小化、绩效最大化，而服务的提供方（疾病预防控制机构）则追求投入最大化，服务对象（广大公众）则从自身角度追求投入最小化、绩效最大化。因此，在明确体系的非合作现实状况的基础上，如何通过优化和控制，探讨每一个利益相关者均能获得较满意效用的合理策略组合方案，从而实现体系目标的优化，也是一个关键性难题。

实践是检验理论的标准，绩效评价如何从理论研究层面向实践操作层面推广也是一个重要环节。如何才能有效地将构建的疾病预防控制绩效评价理论模型框架模型付诸实践，如何将数学模型模拟的结果在实践中得以体现？为解决这一问题，尚需构建绩效评价实践操作方法与流程，通过开发绩效评价管理软件系统将理论和数学模型简单化和可操作化，这又是另外一个关键性技术难题。只有将绩效评价及相关的体系优化策略推广应用到实践中，通过实践工作者的现实操作才能发现体系建设取得的成绩、存在的问题，明确需要重点控制的关键环节与控制点，针对性地提出优化策略，方能促进疾病预防控制体系绩效的持续改进。

参考文献

蔡立辉．2003. 西方国家政府绩效评估的理念及其启示．清华大学学报(哲学社会科学)，18(1)：76～84

郝模，尹爱田，汤真，等．2001. 我国切实落实疾病防制功能政策思路的定量模型．中国初级卫生保健，15(9)：20～22

疾病预防控制体系建设研究课题组．2006. 疾病预防控制体系建设研究报告——问题与对策．北京：人民卫生出版社

李国红，胡善联，陆大经．2002. 医院绩效评价的研究．中国医院，6 (8)：24～27

梁万年．2003. 卫生事业管理学．北京：人民卫生出版社

宁有才．2004. 英国政府绩效评估及其启示．行政与法，(3)：17～19

裴化水，张晓华，李伟．2004. 建立医疗机构经营评估绩效评估指标体系的构想．中国医院，9(8)：50～52

世界卫生组织．2000. 2000 年世界卫生报告．北京：人民卫生出版社

章志远．2005. 行政法学视野中的民营化．江苏社会科学，(4)：147～154

Sewart GB. 1999. The Quest for Value. New York：Harverd Business

撰稿人：王　颖　李程跃　郝　模

复旦大学

精神分裂症和抑郁症是如何发生的

The Mechanisms of Schizophrenia and Depression

精神疾病是 21 世纪影响人类健康的最主要疾病之一。精神分裂症和抑郁症是最为严重的精神疾病。精神分裂症可表现为感知、思维、情感和行为等方面的异常。抑郁症以显著而持久的情绪低落为主要临床特征，是情感障碍的一种常见类型。早在 19 世纪末，克雷丕林（Kraepelin）根据精神分裂症和情感障碍这两种疾病在临床表现、预后和病因学上的不同而将它们划分为两种不同的疾病单元并沿用至今。一个多世纪以来，世界各国学者对精神分裂症和抑郁症进行了大量的研究；然而，到目前为止仍有许多关键问题尚未解决。由于这两种重要精神疾病的病因和发病机制不明，导致临床上缺乏生物学诊断方法和有效的防治措施。

早期有关精神疾病的病因学假说认为精神分裂症和抑郁症是具有器质性基础的脑病。克雷丕林在 1913 年的有关论著中就清楚地表明了这一观点，也正是在他的引导下，有关精神疾病的遗传和神经病理研究才开展起来。在其后多年，精神疾病的生物学研究进展缓慢。众多研究者在不同的研究方向上徘徊不前。从 20 世纪 50 年代开始，精神药理学研究，特别是氯丙嗪及其他抗精神病药的发现为精神疾病的病因学研究提供前所未有的转机，这些发现提示精神疾病具有明确的生物学基础。其后脑影像学技术的发展为精神疾病病因学的研究提供了更为直接的证据。遗传和脑影像学技术的发展对精神疾病病因学研究产生了巨大的影响，神经生化研究也取得了一些成就。

与其他一些躯体疾病如冠心病、高血压、糖尿病相类似，精神分裂症和抑郁症是多种危险因素综合作用所致。这些危险因素大致可分为遗传因素和环境因素。遗传学研究显示，精神分裂症和抑郁症均具有较强的遗传特点，包括家族史、双生子和寄养子研究在内的遗传流行病学研究均支持遗传因素在发病中起有重要作用；但是这些疾病的遗传模式均不符合经典的孟德尔遗传方式，而是一类复杂性遗传疾病。目前较为公认的疾病遗传模式是“多基因微效能模式”，即具有中等或微小作用的多个易感基因的相互作用对疾病的发生至关重要。

有关精神分裂症的研究提示，精神分裂症患者存在一系列脑结构与功能的异常，如脑室（侧脑室和三脑室）的扩大和脑容积（海马、额叶、内侧颞叶、丘脑）的减小、大脑缺乏对称性、海马和内嗅皮质等部位有细胞结构紊乱、前额叶皮质功能的损害、眼跟踪功能异常及 P300 事件相关电位潜伏期的延长等。传统

的多巴胺假说认为，精神分裂症的症状是由于多巴胺活性过度所致。进一步的研究显示，精神分裂症的阳性症状可能与边缘系统的多巴胺活性过度有关，而阴性症状与额叶多巴胺活性减低有关。多巴胺活性的改变可能是由于多巴胺递质的增加或减少，或者是由于多巴胺受体的数目或敏感性的改变。除多巴胺神经递质外，精神分裂症还可能与其他神经递质系统有关，如皮质-纹状体谷氨酸通路的功能缺陷可能导致精神分裂症病理生理改变、5-羟色胺系统异常可引起 5-羟色胺与多巴胺失衡等。

神经解剖研究提示，边缘系统、下丘脑和基底节可能与抑郁症的发病有关。边缘系统主司情感、行为的调节表达，并与内脏功能的调节、摄食行为、性行为、记忆功能等密切相关。边缘系统的杏仁核对正常和异常情感的调节起有重要作用，所涉及的神经递质可能与多巴胺和 γ-氨基丁酸有关。抑郁症患者可能存在多种生物胺的功能异常。在抑郁症患者的血、尿和脑积液中存在异常水平的单胺代谢物高香草酸（homovanillic acid，HVA）、5-羟色胺代谢物 5-羟吲哚乙酸（5-hydroxyindoleacetic acid，5-HIAA）、去甲肾上腺素代谢物 3-甲基-4-羟苯乙二醇（3-methoxy-4-hydroxyphenylgycol，MHPG）。一般认为，5-羟色胺缺乏与抑郁症状有关，5-HIAA 水平的降低与暴力及自杀行为相关，而 5-羟色胺能药物可以有效地改善抑郁症状。此外，神经内分泌异常可能与抑郁症发生发展密切相关，下丘脑-垂体-肾上腺轴的活性过度导致了可的松水平增加。抑郁症还存在促甲状腺激素（thyroid-stimulating hormone，TSH）、生长激素（growth hormone，GH）、促卵泡激素（follicle-stimulating hormone，FSH）、黄体激素（luteinizing hormone，LH）、睾丸激素（testosterone）释放减少，以及褪黑激素（melatonin）的夜间分泌减少。

近年来，精神分裂症和抑郁症的神经发育缺陷假说受到普遍重视，由遗传因素和环境因素（如母孕期感染）共同作用，致使胚胎期大脑发育异常。然而，患者的神经发育缺陷的即刻效应并不显著，但随着进入青春期或成年早期，在外界环境因素的不良刺激下，则会出现抑郁症或精神分裂症的症状。该假说不但可以解释遗传和环境因素的联合效应，还能较好地解释神经生化、内分泌及神经递质系统的异常与脑结构异常的发生机制。

有关精神分裂症和抑郁症的病因与发病机制是近年来非常活跃的研究领域，相关研究一直是精神病学和神经科学研究领域的前沿热点。尽管存在基因与基因之间的相互作用、基因与环境之间的交互作用、疾病现象学和分类学的复杂性和不确定性等问题，加大了对这类疾病研究的难度。然而，经过全球科学家的共同努力，近来精神分裂症和抑郁症的病因学研究已经取得了一些令人鼓舞的发现，特别是在全基因组关联研究及易感基因功能研究方面取得了某些重要发现。相信通过综合利用分子遗传学、神经生物学、行为药理学、神经影像学等多层次技术

系统地研究抑郁症和精神分裂症的神经生物学基础，将极大促进有关精神分裂症和抑郁症的病因与发病机制研究，并取得突破性的进展。

参考文献

Calkins ME, Tepper P, Gur RC, et al. 2010. Project among african-americans to explore risks for schizophrenia (PAARTNERS): evidence for impairment and heritability of neurocognitive functioning in families of schizophrenia patients. Am J Psychiatry

Chen MC, Hamilton JP, Gotlib IH. 2010. Decreased hippocampal volume in healthy girls at risk of depression. Arch Gen Psychiatry, 67(3): 270～276

Esslinger C, Walter H, Kirsch P, et al. 2009. Neural mechanisms of a genome-wide supported psychosis variant. Science, 324(5927): 605

Kim S, Webster MJ. 2010. Correlation analysis between genome-wide expression profiles and cytoarchitectural abnormalities in the prefrontal cortex of psychiatric disorders. Mol Psychiatry, 15(3): 326～336

McMahon FJ, Akula N. 2010. Meta-analysis of genome-wide association data identifies a risk locus for major mood disorders on 3p21.1. Nat Genet, 42(2): 128～131

Potash JB, Bienvenu OJ. 2009. Neuropsychiatric disorders: Shared genetics of bipolar disorder and schizophrenia. Nat Rev Neurol, 5(6): 299～300

Psychiatric GWAS Consortium Steering Committee. 2009. A framework for interpreting genome-wide association studies of psychiatric disorders. Mol Psychiatry, 14(1): 10～17

Purcell SM, Wray NR, Stone JL, et al. 2009. Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. Nature, 460(7256): 748～752

Shi J, Potash JB, Knowles JA, et al. 2011. Genome-wide association study of recurrent early-onset major depressive disorder. Mol Psychiatry, 16(2): 193～201

撰稿人： 李　涛[1]　张　岱[2]

1 四川大学华西医院

2 北京大学第六医院

双相抑郁的早期识别

Early Identification of Bipolar Depression

双相障碍是一种高复发率的慢性疾病，目前已跃升至全球十大公共健康问题之一。对于大多数双相障碍患者而言，抑郁相的发作期包括发作频率和持续时间均远远超过躁狂相或轻躁狂相，给患者造成的功能损害更大。但双相抑郁（bipolar depression，BPD）的诊断率低、治疗率低却是不争的事实。

西方的研究资料显示，BPD 的首发年龄多在 15～20 岁，而临床被诊断的年龄却多在 25～30 岁，即患者在发病 8 年后才被确诊；或者，平均发作 3 次或经过 3 名精神科医生才被明确诊断。80% 的 BPD 患者在确诊前曾被误诊为其他精神疾病，其中尤以误诊为单相抑郁为多。单、双相障碍诊断的要点是有无躁狂或轻躁狂发作，双相障碍至少有一次躁狂、轻躁狂或混合发作，单相障碍仅有抑郁发作而无躁狂、轻躁狂或混合发作。双相Ⅰ型指有一次或多次躁狂发作或混合发作，即界定双相Ⅰ型的要点是临床表现为躁狂发作，而不是轻躁狂；双相Ⅱ型指有明显的抑郁发作，同时有一次或多次轻躁狂发作，但无躁狂发作。现时这种误诊主要发生于 BPD 与抑郁障碍之间。双相Ⅱ型是 BPD 中最多见的临床表现型，在临床诊断为单相抑郁（unipolar depression，UPD）的患者中，可能有 50%～70% 实为双相Ⅱ型。诊断率低必然导致正确治疗率低和临床治愈率低。目前对 BPD 的治疗误区主要有：①对 BPD 的躁狂相只用抗精神病药，而不用心境稳定剂；②对 BPD 的抑郁相只用抗抑郁剂，促使患者转为躁狂，诱发或加重快速循环发作，增加发作频度和缩短正常间歇期；③BPD 维持治疗期不足，导致复发，增加自杀率，严重影响患者的预后及生活质量，增加个人及社会负担。

因此，20 多年前，国内精神病学界曾致力于纠正抑郁症诊断不足的问题；而 20 年后的今天，我们呼吁：应重视从抑郁障碍中甄别出双相抑郁，提高双相抑郁的治疗率和治愈率。

目前，精神科医师主要通过识别抑郁发作的临床特征来寻找双相抑郁的诊断线索。首先，如抑郁发作具以下特征者应警惕为双相抑郁：①早年发病，通常指 25 岁以前起病。资料显示，双相抑郁发病年龄早于单相抑郁，首次发作往往在青春期或成人早期，发病高峰年龄在 15～19 岁。如果以发病年龄在 25 岁以前为标准，对双相抑郁诊断的特异性为 68%，敏感性为 71%。②抑郁发作伴心境不稳定发作，抑郁患者若伴有显著的心境不稳，如难以预测的抑郁、焦虑、欣快、

烦躁不安、紧张、激越、易激惹、冲动、愤怒甚至狂暴等病理情绪短暂发作，往往预示双相Ⅱ型障碍，对双相障碍诊断的特异性达 86%，敏感性为 42%。③抑郁发作伴不典型特征如食欲亢进、体重增加、睡眠过多，伴精神病性特征等，对双相Ⅱ型诊断的特异性为 74%，敏感性为 45%。④抑郁发作如果发病急骤、频繁发作、缓解较快，往往提示为双相抑郁。其次，了解抑郁发作的某些附加特征，可能有助于双相抑郁的识别。有学者认为，伴双相障碍阳性家族史、病前人格为情感旺盛性气质、抗抑郁剂导致转相、环性心境障碍、轻躁狂发作和躁狂发作形成一个由弱转强的双相谱系，抑郁患者只要兼有上述 6 项中的任意 1 项，就可诊断为双相抑郁。最后，从提高轻躁狂发作的识别能力入手，轻躁狂发作，往往持续的时间较短、症状严重程度较轻、对社会功能影响较小，与正常心境的境遇性变化难以鉴别。而且由于患者对这种轻躁狂发作的认知程度很低，家属也未能引起足够重视，提供病史时常被忽略。

要提高对双相抑郁诊断的敏感性，一些简易诊断问卷有助于对躁狂或轻躁狂发作病史的收集。如心境障碍问卷（mood disorder questionnaire，MDQ）和双相谱系障碍诊断量表（bipolar spectrum diagnosis scale，BSDS），对双相障碍的筛查均有较好的诊断效度，可提供给患者或家人进行评定；监测轻躁狂线索问卷（detecting hypomania）、发现轻躁狂的提示性问卷（suggested questionnaire for uncovering hypomania）、监测模棱两可的双相障碍线索（detecting subtle bipolarity）及检测混合状态量表（detecting mixed states）等，有助于发现和识别轻躁狂，提高对双相Ⅱ型诊断的敏感性。

除此之外，在提高临床医师对疾病识别能力的同时，对双相抑郁进行如分子遗传学、神经影像学、神经电生理学及认知功能等多方面的基础科学研究，找寻双相抑郁特征性的生物学标志物，对于客观准确地诊断双相抑郁则显得尤为重要和有意义。而这正是目前双相抑郁研究较为欠缺的领域，亟须开展大量和深入的研究。

参 考 文 献

沈其杰，刘铁榜. 2003. 加强对双相情感障碍的临床研究. 中华精神科杂志，36(4)：193～195

赵靖平. 2004. 提高对双相抑郁的诊断认识和药物治疗水平. 中华精神科杂志，37(3)：129～131

Akiskal HS, Mallya G. 1987. Criteria for the "soft" bipolar spectrum: treatment, implications. Psychopharmacol Bull, 23(1): 68～73

Akiskal HS, Walker P, Puzantian VR, et al. 1983. outcome in the course of depressive illness: phenomenologic, familial, and pharmacologic predictors. J Affect Disord, 5(2): 115～128

Akiskal HS. 1996. The prevalent clinical spectrum of bipolar disorders: beyond DSM-IV. J Clin Psychopharmacol, 16(2 Suppl 1): 4～14

Benazzi F, Rihmer Z. 2000. Sensitivity and specificity of DSM-IV atypical features for bipolar II disorder diagnosis. Psychiatry Res, 93(3): 257～262

Bowden CL. 2001. Strategies to reduce misdiagnosis of bipolar depression. Psychiatry Serv, 52(1): 51～55

撰稿人：江开达　方贻儒

上海交通大学医学院附属精神卫生中心

衰老与老年期常见精神障碍的关系

The Association Between Aging and Mental Disorders in Late Life

人的一生要经历多个不同的发育阶段，简单地讲，可划分为生长期、成熟期和衰老期（老年期）。衰老（senescence）是指生物体细胞、组织、器官在结构及功能上表现出种种不可逆转的退化性改变，是生命运动的自然过程，存在于任何生命的任何时期，只是不同情况下其速率与程度有所差别。也有人将衰老的定义概括为：个体生长发育最后阶段老年期的改变，是有机体在成熟期后对环境适应能力的降低，也是对疾病的易感过程。人类既具有生物老化的共性，又不仅限于生物属性，还有精神、心理的老化及社会适应力的退化。精神老化属于心理学范畴，而中枢神经系统和感觉器官的老化又是心理老化的生物学基础。因此人体老化的特性还应当强调一点，就是从生理到心理、从个体到社会以及与环境因素的相互作用，才是决定人类老化最重要的特征。

在人类进入老年期后，各类精神障碍也进入高发期。社区人口中老年期抑郁症的现患率大于 1%，在因躯体疾病住院的老年患者中可高达 20%。有抑郁症状的老年人占 15% 左右。可以说，老年期抑郁症是一个十分常见的精神障碍。此外，65 岁以上老年人阿尔茨海默病（AD）患病率男性为 3.4%，女性为 7.7%，总患病率为 5.9%。该结果提示，我国 AD 的患病率与西方国家资料接近。根据这一结果估计，我国现有 AD 患者数达 350 多万。

老年人群中的精神障碍，不管是新发于老年期，还是成年期的问题延续到了老年，均与衰老所伴随的生理和心理变化有关。衰老的神经生物学因素既是这些精神障碍的促发或者诱发因素，也可能是其转归中的重要影响因素。因此，了解衰老过程，对我们更好地理解老年期精神障碍的发生发展、制定更有针对性的预防和干预措施十分重要。

衰老的有关研究是随着 20 世纪后期分子生物学与细胞生物学迅猛发展而不断深入的，研究者试图从细胞水平和分子水平进行基本原理的探讨。由于对于人类衰老进行研究周期长、困难大，一般采用从其他物种如蠕虫、果蝇等入手进行研究，也可以采用体外培养人类细胞进行衰老研究。体外培养的人二倍体细胞是研究人体衰老机制方便而有效的模型，也是目前国际公认的研究人体衰老最好的模型之一。但体外培养的细胞，难以体现并反映体内神经、内分泌、免疫的相互作用，难以体现并反映器官、组织中各种细胞的相互作用。然而，研究衰老，从

研究细胞衰老入手，这已经在研究者中达成了共识。此外，也注意到遗传与环境的作用。与衰老有关的基因不断发现，这些基因与老年期疾病的关系也在不断阐明，如 APOE4 基因与冠心病和 AD 的关系。同时研究者也发现，基因的表达受环境的调控，环境常常通过损伤、负荷、疾病等方式影响衰老进程。神经系统的稳定性对衰老进程有重要影响。机体除神经、内分泌、免疫系统共同组成整体防御机制外，细胞亦有一套抵御不良环境、维持内环境稳定的应激能力。应激能力因衰老而下降，它又可转而影响衰老进程。近来研究显示：高等生物的寿限也许取决于内外环境对其施加的压力及机体承受此压力的能力。

老年期精神障碍在很大程度上会对机体的内外环境产生影响，破坏神经系统的稳定性和增加机体的应激程度。如在抑郁症时出现突触间隙神经递质水平的紊乱，神经营养因子浓度下降，最终会出现海马神经元的凋亡。这一病理过程的反复出现，会加速中枢神经系统的衰老。

老年期的精神障碍与衰老的关系十分微妙。随着科学技术手段的进步，一些大脑内部微观和动态的变化可以作为评价正常老化和疾病进程的指标。这类研究常常有十分类似的发现，即这些指标往往并非是正常老化与疾病的明确分界，正常老年人中也可以存在这些指标，而且指标与疾病的进程并非存在着量效关系。这里我们用两个疾病的研究作为例子，看一下人类老化进程中的某些因素与老年期精神障碍的联系。

有关 AD 发病机制的研究发现，AD 的主要病理特征是细胞间质和血管壁的 Aβ 沉积和细胞内神经原纤维缠结（NTF），突触减少，神经元脱失和脑萎缩。海马结构包括嗅内皮质、海马和前脑下脚是 AD 早期病损的最易受累区。Price 等的研究表明，Aβ 沉积和 tau 蛋白病变比嗅内皮质和海马的神经元脱失要早。Mufson 等研究 MCI 鼻内侧皮质的 Aβ 沉积，结果 12 例 MCI 中有 10 例，20 例 NC 中有 12 例和全部 12 例 AD 患者可见 Aβ 沉积。Aβ 沉积有两种类型，即位于皮质 3～4 层的新月状带和位于 2～3 层或 5～6 层。AD 的 Aβ 沉积最严重（4.55），显著高于 NC（1.32）。MCI 的 Aβ 沉积居中（2.60），与 AD 和 NC 组无统计学差异。但个别 NC 的 Aβ 沉积比 AD 和 MCI 还要严重，说明 Aβ 沉积可能不是 AD 或认知损害的唯一病理原因。

最近的研究认为，AD 的大脑中基底神经核神经元（nucleus basalis neurons）含酪氨酸激酶 A 受体（trkA）者显著减少。Mufson 等对 30 例老年人进行尸体解剖，平均年龄为 84.7 岁，这些老人在死亡前的 12 个月内都进行过认知功能检查，平均 MMSE 得分为 24.2 分，其中 9 例诊断为 AD，12 例为 MCI，9 例认知功能正常。尸解显示，AD 和 MCI 含 trkA 的神经元数都比认知功能正常的老人显著减少，MCI 减少 46%，AD 减少 56%，而且 MCI 与 AD 间无显著差异。含 trkA 的神经元数与波士顿命名测验和总体认知功能评价得分显著相关，说明 MCI 有与 AD 相似

的含 trkA 的神经元改变，提示 MCI 是 AD 的早期。

另一个老年期常见的精神障碍是老年抑郁症。老年抑郁症通常是指年龄≥60岁（国内也有研究将其定义为 55 岁）的抑郁症，通常包含早年起病在老年期复发的早发抑郁障碍和起病在老年期的晚发抑郁障碍。近年来有许多文献研究报道了抑郁患者脑白质病变的神经影像学改变。

磁共振脑成像技术的发展为研究大脑的结构乃至功能提供了无创性的检查手段。近年来关于抑郁症白质高信号（white matter hyperintensity，WMH）的研究逐渐增多，研究发现老年抑郁症患者磁共振显示存在白质病变，白质病变主要体现为 FLAIR 像的 WMH 和 DTI 的白质纤维联系受损。

有证据表明 WMH 的发生是与年龄存在高度相关性的，目前有大量的研究表明老年抑郁患者与健康老人相比，WMH 的发生率更高、程度更重。Godin 等开展的 3C-Dijon 研究，对 1658 名年龄 65 岁及以上的被试者进行基线及 4 年随访 MRI 扫描检查脑部白质损伤，基线状态的研究发现终身重度抑郁患者白质损害体积显著增大，纵向 MRI 分析显示基线终身重度抑郁患者白质损害负荷显著增加，对于基线未患抑郁症的样本（$n=956$），基线时患者的白质损害体积越大，4 年随访期内发展为抑郁症的风险越高，提示白质损害与老年抑郁有一定的相关性。Hickie 等研究发现 WMH 的存在能够预测血管型痴呆综合征及老年抑郁患者残余功能损伤的程度。

主要难点：

（1）缺乏比较可靠的衰老模型，对人类衰老过程提出比较全面和合理的解释。

（2）缺乏从正常老化到发生精神障碍过程的敏感而又可靠的预测指标。

（3）缺乏精神障碍本身对大脑内环境影响的评估手段。

参考文献

马宏，张宗玉，童坦君．2002．衰老的生物学标志．生理科学进展，330：65～68

Godin O，Dufouil C，Maillard P，et al. 2008. White matter lesions as a predictor of depression in the elderly：the 3C-Dijon study. Biological Psychiatry，63(7)：663～669

Herrmann LL，Le Masurier M，Ebmeier KP. 2008. White matter hyperintensities in late life depression：a systematic review. J Neurol Neurosurg Psychiatry，79：619～624

Mufson EJ，Ma SY，Cochran EJ，et al. 2000. Loss of nucleus basalis neurons containing trkA immunoreactivity in individuals with mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. J Comp Neurol，427(1)：19～30

撰稿人：于　欣
北京大学第六医院

精神创伤性记忆的形成与消退机制

The Mechanisms of Traumatic Memory：From Formation to Extinction

人类对于由特别恐惧的事件所致痛苦记忆的描述至少已有 3000 年左右的历史。以创伤性不良记忆（如大地震、战争等）为核心的典型临床病理现象是创伤后应激障碍（posttraumatic stress disorder，PTSD），其主要的症状表现为：反复闯入性的创伤性经历的再体验（如创伤相关的“闪回”和噩梦），持久地回避创伤事件有关的刺激（包括内心的体验、想法和谈话等），以及持续性的警觉反应和觉醒水平的增高。这些症状严重损害患者的心理和社会功能，引起患者本人极大的精神痛苦。大规模的流行病学调查资料显示，61% 的男性和 51% 的女性报告在其一生中至少遭受一次精神创伤性事件；遭受各类创伤性事件的幸存者大约平均 8% 的个体会出现 PTSD，其中至少 1/3 以上的人终生不愈，自杀率高出正常人 6 倍。为何这些强烈的精神创伤瞬间就可以留下无法消退的痕迹，而与正常的学习记忆要反复多次还难以保持的机制如此不同？至今人类对此知之甚少。因此，研究创伤性记忆的形成及消退机制对于防治应激相关痛苦记忆无疑具有重要的意义，当然作为一特定的记忆现象对于研究人类正常的学习记忆机制也具有重要的促进意义。

条件性恐惧记忆是普遍认可的 PTSD 解释模型，在动物中也普遍利用这种模型来研究 PTSD 中创伤记忆形成及其消退的机制。其结果表明，杏仁核、海马在条件性恐惧记忆的形成和消退中具有重要作用，而参与其消退的另一个重要脑区则为内侧前额叶。与此相一致，神经影像学研究发现，在人类 PTSD 患者中这些相应的脑区存在着功能或结构异常，如海马萎缩、杏仁核功能活动增强、内侧前额叶功能低下。然而，这些脑区之间的相互关系如何仍不明朗，不能认为只有单向的相互影响或制约关系，这方面的研究仍需进一步深入。

PTSD 的神经生化机制涉及一系列的神经递质和激素，如谷氨酸、γ-氨基丁酸、去甲肾上腺素、5-羟色胺、糖皮质激素及神经甾体激素等。这些激素、递质等神经生化系统涵盖了兴奋性级联或协同、抑制性反馈调节或拮抗功能，其总和效应可能在相当的程度上决定了精神创伤性记忆的形成；而其中同时存在的在不同的时相可能具有完全相反作用的某些成分以及不同受体亚型介导的相反作用则增加了创伤记忆形成过程及其表现的复杂性。但需要注意的是，这些所谓的 PTSD 的神经生化机制存在着相当多的推论性。因此，在记忆再巩固和条件性记

忆消退的背景上进行联系和分析可能有助于这种复杂性的进一步理解和解释。

记忆再巩固现象及其机制的发现和研究可以说颠覆了人们长期对记忆的认识和理解。简言之，已经巩固了的记忆在以后每次激活后会重新进入一个不稳定的易于受到干扰的过程。这个过程中发生的一系列变化对于记忆的重新巩固是必需的，称之记忆激活提取后的再巩固。人和动物的研究表明谷氨酸 NMDA 受体激动剂既可以促进条件性恐惧记忆的再巩固也可以促进其消退；同样，糖皮质激素也可以促进恐惧记忆的消退或者干扰恐惧记忆的提取、再巩固而缓解其恐惧表现或症状；当然与这些研究相平行，去甲肾上腺素能阻断剂则既可以损害恐惧记忆的消退过程也可以损害其再巩固过程。对于抑制性的神经递质 γ-氨基丁酸能系统而言，Akirav I 和 Maroun M（2007）进行的文献复习提示，消退过程随着记忆类型的不同而需要其功能发生时间窗口依赖性的抑制或增强。由此可见，创伤性记忆的形成及其消退机制在某些条件下可能并不是在时间或空间上截然分开或泾渭分明的。或者，以记忆激活为枢纽的条件性恐惧记忆的形成-提取及其再巩固-消退这一序列化的过程是正常情况下调节和适应创伤性应激必需的既有串行又有并行的偶联过程，三者如果不能实现或完成时空整合，则条件性恐惧记忆得不到适当的调节、限制乃至清除，从而导致创伤性记忆的最终形成。这种并非泾渭分明的过程在物种进化上可能反映了记忆调节系统结构和功能构成的经济化原则，可能进而也是记忆需要灵活调节的自然选择的结果。相应地，根据 Dudai Y 等的系统研究，精神创伤性记忆之所以为“创伤性”，可能的原因包括条件性恐惧记忆随着其记忆强度和“年龄”的增加对其再激活后的再巩固过程具有了抵抗性从而失去被正常调节甚至清除的机会，以及（或）其消退过程受损或失偶联而不能对其形成有效且持久的抑制/限制。然而，需要注意的是，这样的证据也还停留在间接的阶段；考虑到大多数的创伤经历幸存者并不发生 PTSD，大样本的研究则可能会提供更为直接的证据。

综上所述，虽然创伤性记忆机制的研究目前已经取得了相当重要的成果，但同时也存在着诸多的难以理解的发现。其原因很多，如动物研究模型的有效性问题、实验中所用的条件性恐惧记忆是否或者在多大的程度上达到了创伤性记忆的水平，以及研究在基础背景上（如遗传、生活经历、个性）与创伤记忆者或对照者的同质性如何等。这反映了创伤性记忆及其机制的错综复杂性。因此，或许应该将其从形成到消退的机制看做是一个“我中有你、你中有我”时空整合性功能系统才能对既往的结果有更深的理解，而由此出发也可能为将来相关的研究提供新的思路。例如，Bredy 和 Barad（2008）及 Lauzon 等（2009）的研究结果提示，研究创伤记忆形成和消退的机制需要找到相应的合适的实验方案。因为面对不同的实验方案，在某些条件下大脑可能做出不同的反应，这种反应或者促进（某些）创伤性记忆而不利于消退，或者不影响原有的记忆却可能促进恐惧记忆

的消退，甚至产生分离性的结果：如同时促进原有记忆成分的巩固和消退；凡此种种组合不一而足，都会导致令人困惑的结果。因此，将来的研究一方面应更多地展现创伤性记忆机制的多面性；另一方面，应该在现有的研究基础上更多地以PTSD患者为研究对象从不同切入点出发来研究其机制。这无疑是一个巨大的挑战，需要神经影像学（如fMRI）、脑电生理学（ERP、经颅磁刺激）、神经分子生物学、遗传学和心理学等多学科结合来深入研究这一科学难题。

参考文献

Alberini CM. 2005. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? Trends Neurosci, 28 (1): 51～56

Cain CK, Blouin AM, Barad M. 2004. Adrenergic transmission facilitates extinction of conditional fear in mice. Learn Mem, 11 (2): 179～187

de Quervain DJ, Aerni A, Schelling G, et al. 2009. Glucocorticoids and the regulation of memory in health and disease. Front Neuroendocrinol, 30 (3): 358～370

Debiec J, Ledoux JE. 2004. Disruption of reconsolidation but not consolidation of auditory fear conditioning by noradrenergic blockade in the amygdala. Neuroscience, 129 (2): 267～272

Friedman MJ, Keane TM, Resick PA. 2007. Handbook of PTSD: Science and Practice. New York: The Guilford Press, 3～18, 166～189

Kessler RC, Sonnega A, Bromet E, et al. 1995. Posttraumatic stress disorder in the national comorbidity survey. Arch Gen Psychiatry, 52 (12): 1048～1060

Lee JL, Milton AL, Everitt BJ. 2006. Reconsolidation and extinction of conditioned fear: inhibition and potentiation. J Neurosci, 26 (39): 10051～10056

Norberg MM, Krystal JH, Tolin DF. 2008. A meta-analysis of D-cycloserine and the facilitation of fear extinction and exposure therapy. Biol Psychiatry, 63 (12): 1118～1126

Rauch SL, Shin LM, Phelps EA. 2006. Neurocircuitry models of posttraumatic stress disorder and extinction: human neuroimaging research—past, present, and future. Biol Psychiatry, 60 (4): 376～382

撰稿人：李凌江　李则宣

中南大学

人际影响的心理机制及其医学运用

Psychological Mechanism of Interpersonal Influences and Its Applications in Medicine

人是社会性动物，其生命活动一部分针对自然环境、物质世界，一部分针对同类，随时需要与别人沟通、协调、合作、竞争、战斗，持续地处理人际间传递的信息，包括威胁、诱惑、理解、共情、信任、依恋等基本形式，并不断做出行为反应。作为心理学中最古老的问题之一，人类至今难以真正理解自己的同类，形成建设性共识。其后果大至战争等人为灾难，小至家庭冲突、人际不和、情绪紊乱、认知困惑、信仰危机、行为失调。破解此难题任重道远，有利于建设和谐世界、和谐社会、和谐心理；在医学、心理学领域，有助于发展有意义的助人技术，如心理治疗与咨询。

从心理学来讲，“人是环境的产物”，指的是人在不断地与别人互相影响的过程中成长，既要影响别人，又要受别人的影响。人与人之间的交流是通过语言和非语言的方式来实现的。人们使用语言、符号、艺术创造，以及使用表情、姿势、动作、安排的特殊仪式和场景，来对别人的心理和行为产生影响。

在医疗保健领域，利用人际间的心理影响进行治疗活动非常普遍，其出现时间早于药物和手术；医者与患者之间的心理影响对疾病的康复常常起到与药物、手术同等重要的作用。存在于世界多个民族中的巫术其本质是心理影响，源自原始的宗教观念，主要使用人类处于童年时期占优势的原始思维方式，通过仪式性行为向神灵和邪魔力量表示驯顺、膜拜、巴结、“贿赂”或示威、驱逐等意向，以图消灾弭祸、健身祛病。它涉及以下几种初级思维过程：魔幻思维、象征-隐喻思维、类比思维，对许多需要解决躯体不适、心理困扰的人表现出“欺骗性说服和控制技术”。

在科学技术发达的今天，由于心理学科普工作的滞后，对与健康和精神现象相关的一些现象仍然充斥着神秘主义、超自然或伪科学的解释。到了近代，基于对巫术和各种流行疗病术的观察与分析，医学家、心理学家初步发现了人际间互动性的心理影响机制，并据此发展了专门的心理治疗技术，用于医治心理的和一部分躯体的疾病。例如在 200 余年前的欧洲曾流行由奥地利人麦斯默发明的“通磁术”，许多患者因为相信麦斯默让他们握在手上的金属棒接通了身上的“磁场”而感到许多症状迅速缓解。后来发现，“动物磁性”这种概念实际上只是充当了

诱导催眠现象的心理媒介的角色，起到暗示的作用；“奇迹疗效”实际上是集体性暗示催眠现象，对“通磁术”所抱有的信念，以及在此基础上形成的对于施术者的崇拜、依恋，以及对“奇迹”的期待和周围人们的互相影响，造成了心身方面的积极感受，这说明施术者与被施术者之间的关系是头等重要的。经过专业训练的精神科医师、心理治疗师，遵循严格的技术、伦理和法律规范，常常在特殊的治疗环境中用它来为有适应证的患者解除痛苦，如果不遵循这些规范，人际影响技术有可能超出其适用的范围和强度而被滥用。暗示是指人在交往时，一方使另一方无条件、无批判地接受自己言语、情绪和行为的影响。强大的暗示可使人进入催眠状态，发生一系列与清醒状态下不同的心理和生理变化。典型的催眠现象是，被催眠者根据暗示出现感觉、认知、情感及行为层面上不由自主的变化。用暗示诱导催眠现象，涉及以下机制：一是接纳新角色，原有社会角色退化；二是年龄退化、幼稚化。以上机制特别容易对缺乏主见与自我意识，人格特点倾向依赖、依恋、被动的人，以及喜欢表现、以自我为中心的人产生作用。

这一发现，成为近现代心理治疗的先导，在后来的100多年中成为精神病学、心理学中的常识，相关的技术是心理治疗的基本操作方法。由于对催眠技术这把“双刃剑”有科学的认识，正规治疗师使用时均严格遵循技术、伦理、法律规范，追求最大限度矫正病态，促进健康，避免恶化病情或引发新的障碍。

使用特殊方法检测人群中暗示性的高低程度时发现，大约10%的人不可以被催眠，20%的人可以很好地被催眠，另外70%左右的人程度居中。这能说明为什么在集体练气功的场所，有的人很快就有“气感”，而一些人却对“气场”的存在毫无感应。不能轻易被催眠的人一般都较有主见，不轻信，对周围的信息保持批判性，只是做有选择的摄取，而这种不能轻易受暗示的人常被认为是“心不诚”。

可见，揭示人际影响的心理机制，将其科学地运用于医学领域，对于造福人类是非常有意义的。事实上，人际影响的心理学机制是众多学科的关注热点，尤其涉及精神医学、心理学、文化人类学、社会学，以及重点研究精神活动物质基础的神经科学，可谓从宏观到微观、从群体到个体、从精神到物质，“八仙过海，各显神通”。在医学领域，研究的重点是由遗传、后天养育环境、个人生活经历塑造的心身素质、个性，面临的应激处境及其应对方式，如何在具体的人际互动过程中发挥影响？人际互动的认知信息是如何加工的？认知信息如何经由神经-内分泌-免疫系统的中介机制引发躯体内的情绪和行为反应，并且导致积极的和消极的生理后果？文化因素，如宗教信仰、健康信念、社会阶层观念等，如何影响个体、直接人际系统、亚文化群体和社会群体的互动模式？

目前，围绕以上问题的文献汗牛充栋，但迄今为止对谜团的解释仍只是盲人摸象，没有比较系统的令人信服的答案。有的理论假说失之空泛、宏观，有的又

有局限、片面之嫌。最大的难点在于心理的研究实际上涉及“理解的心理学”和“解释的心理学”两大范畴，前者多用哲学、人文科学范式，感兴趣于意义系统，而后者追求用自然科学方法对心理的物理、化学机制进行分析-还原式的索解，至今未找到合适的交集之处。理想的方法应该是两者的结合与融合，能够促进对人际互动影响机制的整体和系统的理解。

参考文献

赵旭东．1998. 非常意识状态．昆明医学院学报，18(2)：97～103

Geller E Scott. 2006. Interpersonal trust：what is it and how can it be increased？ Journal of Management，32(6)：991～1022

Lewicki Roy J，Tomlinson Edward C，Gillespie Nicole. 2006. Models of interpersonal trust development：theoretical approaches，empirical evidence，and future directions. Journal of Management，32：991～1022

Mcallister Daniel J，Lewicki Roy J，Chaturvedi Sankalp. 2006. Trust in developing relationships：from theory to measurement. Academy of Management Best Conference Paper. CM：G1

McKenna Katelyn YA，Green Amie S，Gleason Marci EJ. 2002. Relationship formation on the internet：what's the big attraction？ Journal of Social Issues，58(1)：9～31

Singer TM. 1990. Cult in Our Midst. San Francisco：Jossey-Bass Inc

Wright Kevin B. On-line relational maintenance strategies and perceptions of partners within exclusively internet-based and primarily internet-based relationships. Communication Studies，55(2)：239～253

Zhao X. 2009. mental health in contemporary China. In：Incayawar M，Bouchard L，Wintrob R，eds. Psychiatrists and Traditional Healers：Unwitting Partners in Global mental Health. Chichester，UK：John Wiley & Sons，135～149

撰稿人：赵旭东

同济大学

儿童和青少年精神障碍治疗的循证医学

Evidence-Based Medicine for Treatment of Mental Disorders in Children and Adolescents

根据世界卫生组织（WHO）报道，精神障碍是导致全球残疾的首要原因之一。回顾性研究和前瞻性研究结果都表明多数成人期的精神障碍起病于儿童和青少年期。精神障碍也是青少年中最常见的疾病，在疾病总体负担中是残疾调整生命年的最主要因素，在该人群中相当于癌症和心血管疾病的三倍。在北美儿童和青少年中有 15%～20% 罹患某种形式的精神障碍。另外，70% 的精神障碍起病于 25 岁之前，呈慢性病程，预后不良，影响人际交往、社会功能和躯体健康等方面，使得青少年深感被社会所隔绝、内心充满羞耻感。

儿童和青少年精神障碍的病理机制和临床表现十分复杂，一些治疗措施能够缓解症状或者预防复发及可能出现的不良预后，儿童和青少年期精神障碍的治疗直接关系到儿童的发展和成年期精神障碍的预防。目前在应对儿童和青少年精神疾病方面还存在很多空白，包括神经生物学、病因学研究，最有效、安全和耐受性最好的治疗手段研究等。因此，儿童和青少年精神卫生问题是当今社会面临的一项最重要的挑战和任务。

儿童和青少年精神障碍的治疗包括药物治疗和心理治疗，大多数情况下是沿用成人的治疗方法，很少就儿童的特点展开研究；或直接应用国外研究结果，缺乏本土的循证医学研究。以如下三种疾病为例进行分析：

（1）早发精神分裂症谱系障碍（early-onset schizophrenia-spectrum，EOSS）指起病于 18 岁之前的精神病性障碍，常常导致慢性功能损害，对抗精神病药物的反应较差。现有的有关抗精神病药治疗儿童和青少年 EOSS 的资料表明，目前共有 10 项临床试验是双盲研究，疗程 4 周或以上，且入组 15 名以上患者。与安慰剂相比，抗精神病药物能够减轻精神症状的严重度。氯氮平的疗效优于氟哌啶醇、标准剂量的奥氮平及高剂量的奥氮平。然而，目前尚缺乏其他第二代抗精神病药物之间临床疗效的比较研究。现有的短期研究结果表明，儿童和青少年患者在抗精神病药物相关的不良事件方面（如锥体外系副作用、镇静、泌乳素升高、体重增加等）比成年人更敏感，还能够增加儿童和青少年人群出现糖尿病的风险。目前在 EOSS 治疗方面尚存在许多有待解决的问题。①现有的研究仅仅评估短期疗效，而没有进行功能结局的评估。②缺乏联合社会心理治疗的资料以及二

代抗精神病药物之间进行比较的“头对头”研究。③有必要研究抗精神病药物针对儿童和青少年人群的作用机制，迫切需要制订相关治疗策略来预防和（或）缓解抗精神病药物导致严重不良事件（如体重增加和糖尿病问题）。进行EOSS研究最大的困难是受试者的入组问题。目前的解决办法是：进行多中心研究和纳入社会心理治疗措施。

（2）抑郁障碍的患病率在儿童期是3%，青少年期是8%，这些人群在成人期罹患抑郁情绪的风险是儿童和青少年期无该疾病者的2～4倍。药物治疗是Axis I精神障碍的主要治疗措施。二代抗抑郁剂包括SSRI、SNRI和其他二代抗抑郁剂。根据7～18岁儿童和青少年的临床对照试验文献，目前氟西汀是唯一被FDA批准的用于治疗儿童（2～12岁）和青少年（13～18岁）抑郁障碍的二代抗抑郁剂。氟伏沙明和舍曲林虽被批准用于治疗儿童强迫性障碍，但是未被批准用于治疗抑郁障碍。经过系统综述八种抗抑郁剂的研究结果，最终表明除了氟西汀，在儿童人群中的临床试验资料无法验证其他药物的疗效，氟西汀具有较好的风险效益比；另外，所有的药物都存在自杀和自伤观念的风险。但是在已发表的文献中，没有任何“头对头”试验比较两种二代抗抑郁剂治疗儿童和青少年抑郁障碍的差别。

（3）注意缺陷多动障碍（ADHD）是儿童和青少年期最常见的精神障碍，其中30%～50%的症状可迁延至成人期。儿童ADHD的治疗包括各种心理社会干预以及必要时联合药物治疗。目前资料表明，儿童ADHD药物治疗是有效的，尤其是有更多的循证依据支持中枢兴奋剂中哌甲酯的有效性。与其他已经大量用于儿童的药物相反，治疗ADHD的药物是获得批准并且说明书注明的。虽然中枢兴奋剂的使用较多，但是仍然缺乏其对儿童生长发育和营养状况影响的长期研究。另外，ADHD药物已经逐渐用于青少年或成人，但是目前尚缺乏各年龄阶段ADHD药物长期疗效的循证研究。关于ADHD的多种儿童和家庭心理治疗方法已经被实践所验证，具有良好的治疗效果，尤其是家长培训。这些培训方案通过传授家长更有效的应对、交流和养育技巧，使得家长能够处理日常的生活压力。虽然几十年来发达国家已经确定了ADHD的患病率，但是发展中国家近几年才开始进行该研究。由于缺乏对ADHD的认识，许多儿童被贴上了“懒惰”、“笨孩子”或者“捣蛋鬼”的标签，常常遭受体罚，而不是接受正确的家庭心理治疗措施。

可见，为解决儿童和青少年精神卫生问题，我们需要：①不断投入资金进行本土的循证医学研究，以便识别早期发病的精神障碍，并进行有效的早期干预；②制订儿童和青少年精神卫生工作方案、政策和干预措施，并且以有效、科学、充分的循证研究为基础。

参考文献

Fayyad JA, Farah L, Cassir Y, et al. 2010. Dissemination of an evidence-based intervention to parents of children with behavioral problems in a developing country. Eur Child Adolesc Psychiatry, 19(8): 629～636

Kumra S, Oberstar JV, Sikich L, et al. 2008. Efficacy and tolerability of second-generation antipsychotics in children and adolescents with schizophrenia. Schizophrenia Bulletin, 34(1): 60～71

Kutcher S, Davidson S, Manion I. 2009. Child and youth mental health: Integrated health care using contemporary competency-based teams. Pediatr Child Health, 14(5): 315～318

Kutcher S, Venn D. 2008. Why youth mental health is so important. Medscape J Med, 10(12): 275

Meijer WM, Faber A, van den Ban E, et al. 2009. Current issues around the pharmacotherapy of ADHD in children and adults. Pharm World Sci, 31: 509～516

Merikangas KR, Nakamura EF, Kessler RC. 2009. Epidemiology of mental disorders in children and adolescents. Dialogues Clin Neurosci, 11(1): 7～20

撰稿人：王玉凤　钱秋谨

北京大学第六医院

吸毒成瘾与酒精依赖

Drug Addiction and Alcohol Dependence

毒品滥用在人类社会已经有很长的历史，但仍然是目前全球面临的一大社会和医学难题。据2009年世界毒品报告，全球15～64岁年龄段人口中，有1800万～3800万人吸毒成瘾。在各种毒品中，阿片类毒品是最常见的类型，全球有1500万～2100万人使用阿片类毒品。其中，亚洲约占全球的一半。吸毒成瘾带来了严重的个人、家庭和社会问题，包括吸毒者在毒品折磨下出现精神和生理问题，巨额毒资迫使吸毒者偷抢引发相关社会犯罪，导致家破人亡，而且注射吸毒还引发艾滋病等严重传染病的广泛流行。据估计，全球3300多万艾滋病病毒感染者/患者，约1/3与注射吸毒有关。

毒品在我国造成的社会危害已经有上百年历史。解放初期至改革开放以前的约30年间，我国基本禁绝毒品。从20世纪80年代初开始，毒品从金三角的中缅边境进入中国，并随着毒品贩运通道逐步向内地蔓延扩散。我国登记在册吸毒者由1990年的7万人，增加到2000年的86万人，再增加到2009年的120万人。同时，毒品呈现多样化，在大中城市新型毒品使用不断增加。

饮酒是人类生活活动中的一种非常普通的生活方式。在国际上，酒已经被认为是一种软性毒品。《国际禁毒公约》中，酒、烟和毒品一并被认定为“有依赖性特性”的物品。然而，中国人对饮酒有着特殊的看法，或者说更多地从生活方式或文化的角度去看这一现象，俗有“无酒不成席”的说法。据统计，我国工商业从业者饮酒比例高达63.9%，其中又有47.1%为重度饮酒。饮酒引发的社会问题虽说属于老生常谈，但问题的严重性却不容忽视。据悉，中国每年死于酒精中毒的人数超过11万，占总死亡率的1.3%。每年由于酒后驾车引发的交通事故有数十万起，其中死亡事故半数以上都与酒后驾车有关。2006年，世界卫生组织在《西太平洋地区减少酒精危害计划》的报告中，将中国列为世界酒精“重灾区”之一。

饮酒及酒精依赖更是欧美国家的严重问题。俄罗斯可能是世界上酒精依赖危害最严重的国家之一，其15～54岁的男性死亡率比西欧高5倍，女性死亡率比西欧高3倍。据分析，俄罗斯这一年龄段的男性死者约有3/4由酒精直接或间接造成，女性死者约有1/2由酒精直接或间接造成。俄罗斯总统称，酒精依赖已经成为其国家灾难。酒精依赖也给美国社会带来严重问题。据美国酒精依赖研究所

分析报告，每年由于酒精依赖造成美国经济损失约 1840 亿美元。澳大利亚因为酒精依赖造成直接经济损失约 60 亿美元。

吸毒成瘾与酒精依赖同属一类难题，主要表现为成瘾者无法控制自己的吸毒/饮酒行为，每天要吸食或注射一次或多次毒品，或者饮用一定的酒精。无论是通过自我控制，还是采取外在环境的强力干预，都不能使其终止吸毒/饮酒行为。实际上，每个吸毒/饮酒成瘾者都想彻底戒断吸毒饮/酒行为，并且，绝大多数成瘾者都想方设法努力去戒断，最后形成了成瘾-戒断-复发-再戒断-再复发，循环往复，以致无穷，直到生命终止。对于吸毒与戒毒出现了这样一种说法，“一日吸毒，终身戒毒；一日尝毒，终身想毒”。

吸毒成瘾和酒精依赖给人类社会造成巨大危害。认识成瘾和依赖现象，特别是从生理、生化水平理解毒品和酒精在人体内的代谢过程。它们在人体内在分子水平上发生生化、生理反应，以及产生成瘾的作用机制，对于研制治疗药品，探索有效戒断毒品的方法，减少毒品对人类的危害，具有重大意义。

毒品成瘾和酒精依赖不仅仅是自然科学中的毒品和酒精中物质成分在身体内发生生理、生化反应，它更是在这些生理和生化反应后产生的心理、精神和社会环境因素的交互作用的结果。在这方面加深认识，可能对于破解毒品成瘾和酒精依赖更具科学意义。

世界很多国家的科学家们都在研究吸毒成瘾和酒精依赖现象，试图攻克这一世界难题。

为了帮助吸毒者彻底戒断毒瘾，人类进行了很多积极探索。社区戒毒治疗门诊是全球最为普遍的治疗方法：在医生指导下，吸毒成瘾者停止吸食毒品，用治疗药品逐渐减量，直至彻底停止。这种治疗，一般为数周。治疗期间，吸毒者停止吸毒；治疗一旦停止，吸毒者很快又恢复吸毒习惯。

对于自愿戒毒治疗仍不能戒除的毒瘾，世界很多国家都采取强制隔离戒毒方法。人们认为，吸毒者经过强制性地“终止”吸毒一段时间后，比如一年或两年，就应该不再吸毒了。实际上，吸毒者经过强制性戒毒后，一旦回到社会，很快又重新吸上毒品。在现实生活中，有些吸毒者进强制戒毒所戒毒就有 30 多次，仍然无法戒断。

美沙酮是阿片受体激动剂，属麻醉镇痛药，第二次世界大战时由德国化学家合成。1960 年在美国研究发现该药能控制海洛因的戒断症状，开始用于戒毒治疗。30 年来，成为欧美西方国家主要的戒毒药物。治疗毒品成瘾，特别是阿片类毒品成瘾，目前全球最常采用的方式是美沙酮维持治疗。吸毒成瘾患者每天服用一定量的美沙酮口服液，使得吸毒者不会出现毒品戒断症状。美沙酮治疗阿片类毒品成瘾，已经使用了 40 多年。存在的主要问题是，吸毒者脱失现象严重，同时偷吸毒品现象普遍。吸毒者反复参加治疗，退出治疗，又参加治疗，又退出

治疗。这种方式与反复发生的戒毒、复吸、再戒毒、再复吸方式很类似。吸毒者本来是想通过美沙酮治疗来彻底戒断毒品，于是采取逐渐减少美沙酮剂量，减少到一定程度后，低剂量的美沙酮无法抑制吸毒者对阿片类毒品的渴求，于是偷吸毒品，或者从美沙酮治疗中脱失，回到吸毒老路。在经过一段时间吸毒后，患者又想得到美沙酮治疗，于是又回到美沙酮门诊治疗。因此，美沙酮也没有完全解决吸毒成瘾问题，对于多数吸食阿片类毒品成瘾者来说，它仅在一定程度上解决一部分人的一部分问题。

丁丙诺非属于阿片受体的半激动剂，具有激动和拮抗阿片受体的双重作用，其镇痛作用强，可缓解海洛因成瘾者脱毒后期的戒断症状。其依赖潜能低，成瘾性低于美沙酮等强激动剂，停药后没有反跳现象。其占据阿片受体，滥用海洛因不再具有以前的欣快感，从而淡化了海洛因渴求。有较高的安全性，剂量增加超出一定范围后有封顶效应，其激动作用不再增加，引起呼吸抑制等不良反应的可能性比较低。对消除海洛因成瘾，停药出现的戒断症状作用明显，具有美沙酮和纳曲酮合用的效果，特别是对海洛因的心理渴求有抑制作用。其舌下含片适用于海洛因依赖的后期脱毒治疗和维持治疗。丁丙诺非由于价格昂贵，其使用范围不像美沙酮那样广泛。同样，丁丙诺非也存在美沙酮治疗类似的情况，并不能彻底解决吸毒成瘾问题。

纳曲酮是一种常被用于治疗酒精和毒品成瘾的药物。纳曲酮是阿片受体拮抗剂，能阻断外源性阿片类物质与阿片受体的结合，对 μ、δ、κ 三种阿片受体均有阻断作用。纳曲酮不产生耐受性和依赖性，对阿片类依赖者，纳曲酮可催促产生戒断综合征。纳曲酮可阻断外源性阿片类物质的药理作用，作为阿片类依赖者脱毒后预防复吸的辅助药物。

上述几种药品都是药理学家根据毒品在人体内的代谢过程和造成成瘾的生物化学反应过程，提出的阻断毒品受体的设想。例如，采用纳曲酮阻断人体中的海洛因受体，吸毒者经过纳曲酮治疗后，再吸食海洛因，就不再产生快感，这样吸毒者就不再吸食海洛因了。这一科学设想，在实际应用后，并没有出现理论期望的结果。

目前对于吸毒成瘾及其治疗，仍然没有神奇的灵丹妙药。自愿戒毒治疗、强制隔离戒毒、美沙酮维持治疗，都为吸毒成瘾者提供了治疗的选择，这些仅在一定程度上部分解决吸毒者在一段时间内的吸毒问题。在解决吸毒成瘾问题方面，仍然需要科学探索。

另外，很多人都认为，酒精依赖主要是个人没有控制能力。实际上，酒精依赖同吸毒成瘾类似，不能简单地从个人控制能力来考虑，长期饮用酒精，已经在人体内发生了生物学和心理上的依赖。目前，世界上用于治疗酒精依赖的药品主要有三种：戒酒硫、纳曲酮和阿坎酸。

戒酒硫（disulfiram）是最早用于治疗酒精依赖的药品，其作用原理是中断酒精在人体中的生理代谢过程。当戒酒硫与酒精同时饮用时，患者会出现恶心、呕吐。患者由于难以忍受这些痛苦，从而出现戒酒。理论上听起来很好，戒酒硫已经有 50 多年的使用历史了，其实际效果远不如理论所说的。

纳曲酮（naltrexone）是纯的阿片受体拮抗剂，其治疗酒精依赖的作用机制还不清楚，推测可能与其竞争阿片受体，阻止饮酒后释放多巴胺，从而减少饮酒给人带来的快感。美国 1994 年批准纳曲酮用于治疗酒精依赖，实际效果比较有限。

阿坎酸（acamprosate）是近年才被美国批准的酒精依赖治疗药品。多数研究提示，该药能够帮助戒酒者长期保持。该药戒酒的作用原理还不清楚，其长期效果也有待更长时间的进一步观察。

主要难点：在毒品/酒精化学成分的作用下，吸毒者或饮酒者感受到吸毒或饮酒后带来的欣快感，并在记忆中形成正反馈，迫使吸毒者或饮酒者再次吸食毒品或饮酒，吸毒者很快形成毒瘾、饮酒者产生依赖，并在毒瘾影响下，无法控制自己的吸毒行为或饮酒行为，每天必须要吸食或注射一次或多次毒品，或者饮用足够量的酒精。这种强迫性的吸毒行为或饮酒行为，无论是通过吸毒者/饮酒者自我控制，还是采取外在环境的强力干预，都不能使其终止。

目前，无论是采取心理咨询还是药物治疗，都无法终止吸毒成瘾者的吸毒习惯，无法终止酒精依赖者停止饮酒。因此，寻找成瘾治疗药物，或者研制治疗吸毒成瘾或酒精依赖的疫苗，成为当今医学领域的一大难题。

科学家们仍然没有弄清楚，毒品和酒精在人体内的代谢过程中，特别是在与神经受体结合后，发生确切的生物化学变化，以及这些化学物质对人体在生理和精神上的影响。

奇怪的是，镇静类毒品与兴奋剂类毒品，两者在人体中产生的作用完全相反：一种是发生镇静作用，使用者用过毒品后很安详，而另一类毒品是发生兴奋作用，使用者用过毒品后很兴奋、狂躁，但两类毒品的使用者却都产生了同样的成瘾行为。酒精在人体内的代谢与毒品又不相同，但也产生了类似的依赖现象；而长期使用烟草的人，也产生了成瘾现象。近年来网络的发展，在一些长期使用网络的青少年中，也出现了网络成瘾现象。这些现象提示我们，成瘾性物质可能有其化学物质在发挥作用，但更可能是由长期使用产生的一种习惯或者生活方式。

人类对于成瘾性的认识还非常有限，破解这一难题，也是今后相当长时期内人类面临的挑战。

参考文献

Durrant R, Adamson S, Todd F, et al. 2009. Drug use and addiction: evolutionary perspec-

tive. Australian and New Zealand Journal of Psychiatry, 43: 1049～1056

Lawrence AJ. 2007. Therapeutics for alcoholism: what's the future? Drug and Alcohol Review, 26: 3～8

Scheurich A. 2005. Neuropsychological functioning and alcohol dependence. Current Opinion in Psychiatry, 18: 319～323

UNAIDS. 2008. 2008 Report on the Global AIDS Epidemic. Geneva: UNAIDS

Wright TM, Myrick H. 2006. Acamprosate: a new tool in the battle against alcohol dependence. Neuropsychiatric Disease and Treatment, 2(4): 445～453

撰稿人：吴尊友

中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心

药学篇

抗体基因重排的分子机制

The Mechanism of Gene Rearrangement on Antibody

1. 研究背景

哺乳动物的 B 细胞在中枢免疫器官——骨髓中发育成熟，而骨髓中 B 细胞的分化发育过程所经历的主要事件是膜表面功能性 B 细胞（抗原）受体（B cell receptor，BCR）的表达和自身免疫耐受的形成。其中 BCR 是膜表面免疫球蛋白（membrane immunoglobulin，mIg），由重链（heavy chain，H 链）和轻链（light chain，L 链）组成，因其 N 端可变区（variable region，V 区）结构具有多样性，组成了能与成千上万种抗原结合的外周 B 细胞抗原识别受体库（repertoire）。而 BCR 的多样性则是在个体发育过程中，由决定抗原受体结构的基因发生重排所致。

以往认为，B 细胞表面经重排所产生的特定 BCR 不再变化，当 B 细胞在骨髓中发育到不成熟阶段，细胞表面表达 mIgM-Igα/Igβ BCR 复合物，经与自身抗原呈高亲和力结合时，该 B 细胞克隆被选择并发生克隆消除，即所谓的 B 细胞中枢耐受机制。只有非自身抗原特异性受体的 B 细胞才可以进一步分化成熟，并进入外周淋巴组织，行使其介导适应性免疫应答、形成免疫记忆之功能。

然而，近年的研究对克隆选择学说提出了挑战，认为 BCR 特异性选择不仅仅停留在 B 细胞克隆水平，也可能发生于受体分子水平，即经过重排所形成的 BCR 在特定条件下还可发生新的重排，使其结构发生改变形成新的 BCR，导致原有识别自身抗原的 BCR 特异性向其他特异性漂移、B 细胞克隆不再对自身抗原发生应答，这一现象被称为受体编辑（receptor editing）。受体编辑不但可发生在中枢发育早期不成熟 B 细胞，也可发生在外周成熟 B 细胞，主要改变 BCR 的亲和力。为区别中枢受体编辑，外周受体编辑又称为受体修正（receptor revision）。

2. 基因重排

目前已知，BCR（或抗体）由其基因（Ig 基因）编码，其中 L 链由 κ 链基因或 λ 链基因，包括 V、J、C 三个基因簇编码；H 链由 H 链基因，包括 V、D、J、C 四个基因簇编码（表 1）。在未分化 B 细胞中，BCR 基因处于分隔、无转录活性的胚系（germline，GL）状态。当 B 细胞进入分化、成熟过程中，在特异性重组酶的介导下，无功能的胚系基因片段将有序连接成一个完整的、有转录活

性的、可编码 BCR L 链或 H 链的功能基因。

在重排时，H 链 V 区（VH）基因首先重排：先进行 DJ 连接（某一 D 片段和某一 J 片段相连），再进行 V-DJ 连接（某一 V 片段和已重排的 DJ 片段相连），形成 VDJ 片段（编码 VH）；后者再与 C 区基因相连，形成一个完整的 H 链功能基因。VH 基因的重排，可诱导 L 链 V 区（VL）基因的重排。VL 基因无 D 片段，直接进行 VJ 连接，形成有转录活性的 VJ 片段，尔后再与 C 区基因连接，形成一个完整的 L 链功能基因。通过对完整 H 链和 L 链的进一步加工、组装，即形成有功能的 BCR。重排过程中，存在等位排斥和同（种）型排斥现象。BCR 基因重排是 B 细胞特有的，决定了该 B 细胞以后所产生抗体的特异性。

3. 基因重排的分子机制和主要研究方法

BCR 重排过程涉及多因素的调控，如重排激活基因（RAG）编码的重组酶 RAG1、RAG2 和末端脱氧核苷酸转移酶（TdT）、重排信号序列（RSS）、顺式作用元件，以及 IL-7、CD40 等分子参与调控。其中 RSS 分隔胚系基因的 V、D、J 片段，为一段由“七聚体（heptamer，CACAGTG）-间隔序列-九聚体（nonamer，ACAAAAACC）”组成的寡核苷酸序列，间隔序列为 12 或 23 碱基对；基因重排时，由 RAG 编码的重组酶能特异识别并切除 V、D、J 片段间的 RSS，从而将处于分隔状态的基因片段连接成一个完整的 Ig 功能基因。此外，TdT 在 D-J 和 V-DJ 连接中，可催化 DNA 链 3′断端以不依赖模板的方式随机添加数个核苷酸，参与 N 区（或称 N 核苷酸，为非生殖细胞系编码的核苷酸）的形成，进一步增加 BCR 库的多样性。由于 RAG1 和 RAG2 在 VDJ 重排过程中是切割 DNA 所必需的，因此 RAG 基因的开放表达及作用位点确定，成为研究 BCR 基因重排、特别是中枢受体编辑和外周受体修正发生的关键。

较免疫细胞或免疫分子之间相互作用，BCR 基因重排和受体编辑/修正研究体系更加复杂，需采用更新、更精细的分子生物学分析技术和模式动物。目前常采用套式 PCR 及连接介导 PCR（ligation-mediated PCR，LM-PCR）等手段检测重排中间体及确定 BCR 的特异性漂移，利用染色质免疫沉淀技术（chromatin immunoprecipitation，ChIP）对 RAG1 或 RAG2 结合 DNA 进行定位，通过标签蛋白的表达对 RAG 表达进行定量和示踪定位。正常状态下，带有某种特定 BCR 的 B 细胞克隆不足体内 B 细胞库的 1/107，因此要对该 B 细胞克隆进行更深层次的研究和分析，如受体编辑/修正的类型、模式及产生诱因等，仅细胞数量就难以达到要求。而实验动物学的发展，如转基因动物、基因敲除/突变小鼠的应用，最大限度克服了这一不足。转特异性 BCR 基因动物已用于观察 BCR 识别抗原特异性的漂移、RAG 表达变化、重排中间体的形成等。

4. 存在问题及研究意义

BCR 重排过程因涉及多因素的调控，所以机制十分复杂，尽管许多学者采

用多种方法进行了长期的研究，但仍对导致BCR基因重排、特别是受体编辑/修正开放与关闭的分子机制知之甚少，主要表现在：①顺式作用元件（包括增强子和启动子）可通过改变染色质的结构，使RAG重组酶易于接近特定RSS区，但其如何改变染色质结构的机制尚不十分清楚；②表观遗传学调控（包括去甲基作用和乙酰化作用）：增强子可调节BCR基因的去甲基化，对重排具有促进作用，V（D）J重排与组氨酸的乙酰化密切相关，而组氨酸乙酰化又依赖于增强子的存在，因此彻底搞清去甲基作用和乙酰化作用在活化重排中的作用机制，可能对深入探讨增强子元件改变染色质结构的机制起到补充作用；③经典的理论认为成熟的B细胞不再表达RAG，然而近来的研究结果表明，RAG重组酶的消长不仅伴随着B细胞的发育成熟，而且调控着受体编辑/修正，那么，何种因素调控RAG基因的开放与表达，诱导中枢B细胞发生受体编辑、外周成熟B细胞发生受体修正？这种经历了受体编辑/修正的B细胞还能发生重排吗，调控机制如何？

鉴于发生在中枢的受体编辑可让早期发育所形成的针对自身抗原反应的B细胞向针对外来抗原反应的B细胞转化，在维持中枢耐受的同时，使其参与适应性免疫应答，从而丰富抗原受体库的多样性；而发生在外周的受体修正，不仅可进一步纠正针对自身抗原反应的B细胞受体，还能够增加BCR的亲和力，使其更适应于识别外来抗原。因此，深入研究BCR重排分子机制对于阐明B细胞中枢和外周耐受机制、进一步理解B细胞受体库的多样性和抗体亲和力成熟等具有重要的理论意义。此外，已知许多自身免疫性疾病的发生、肿瘤的形成、感染、免疫缺陷、移植排斥等与B细胞受体编辑/修正的异常密切相关，那么通过调变手段对B细胞受体编辑/修正过程进行定向诱导以逆转或缓解疾病的状态，对了解相应疾病的发生机制和对疾病的治疗均具有实际应用价值。然而，这些都必须建立在对BCR重排分子机制有更深刻的认识基础之上！

参考文献

金伯泉. 2001. 细胞和分子免疫学. 第2版. 北京:科学出版社,96～101

Bashyam H. 2007. Receptor editing: how B cells stay tolerant. J Exp Med, 204(8): 1735

Bowen AJ, Corcoran AE. 2008. How chromatin remodelling allows shuffling of immunoglobulin heavy chain genes. Mol Biosyst, 4(8): 790～798

Casellas R, Shih TA, Kleinewietfeld M, et al. 2001. Contribution of receptor editing to the antibody repertoire. Science, 291(5508): 1541～1544

Chen J, Alt FW. 1993. Gene rearrangement and B-cell development. Curr Opin Immunol, 5(2): 194～200

David J, Cosmas G, Raul M, et al. 2006. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. Annu Rev Immunol, 24: 541～570

Halverson R, Torres RM, Pelanda R. 2004. Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens. Nat Immunol, 5(6): 645～650

Ji Y, Resch W, Corbett E, et al. 2010. The in vivo pattern of binding of RAG1 and RAG2 to antigen receptor loci. Cell, 141(3): 419～431

Johnson K, Reddy KL, Singh H. 2009. Molecular pathways and mechanisms regulating the recombination of immunoglobulin genes during B-lymphocyte development. Adv Exp Med Biol, 650: 133～147

Zouali M. 2008. Receptor editing and receptor revision in rheumatic autoimmune diseases. Trends Immunol, 29(3): 103～109

撰稿人:杨　琨

第四军医大学

抗体的多样性是如何产生的

How Is Such a Diversity of Different Antibodies Produced

人们每天的生活中，无时无刻不接触着寄生虫、细菌、病毒及各种传染源。例如，一位流感患者在你身边打个喷嚏，这个喷嚏里所含的病毒数量就能达到30万之多。我们每天接触到的钱币、电脑鼠标、公交地铁的扶手等，无一不携带各种致病微生物。那么，为什么我们绝大多数人能够安全地生活在这个充满病原体的世界里而很少得病呢？这要归功于人体的免疫系统。

免疫系统是保护人体免受外来侵犯的天然防御系统，由物理屏障、先天性免疫和获得性免疫三部分组成。完整的皮肤和黏膜是机体物理屏障的第一道防线，它使得病原体没有可乘之机。当皮肤和黏膜受损后，病原体通过破损部位侵入机体时，机体的第二道防御系统，即先天性免疫开始发挥作用。执行先天性免疫功能的细胞主要包括吞噬细胞、自然杀伤细胞、单核细胞等，它们像哨兵一样游走于人体组织和体液的各个部位。当遇到病原微生物时，这些细胞不仅可以直接吞噬消灭入侵的病原体，而且还会发出特殊信号招募更多的防御者聚集到伤口部位以消灭入侵者。在植物和低等动物中，上述两道防线足以保护自身的安全。然而，在人类及其他脊椎动物还有更为复杂的第三道免疫防御系统，即获得性免疫（也称为特异性免疫）。人们对于获得性免疫的认识是从接种天花疫苗开始的。早在18世纪90年代，成千上万的人死于天花。Edward Jenner注意到挤奶工人经常感染上一种称为牛痘的疾病，手上出现了类似天花病毒引起的脓疱，而这些人从不患天花。于是，他做了一个大胆的实验，从挤奶工人身上收集脓性分泌物，接种于小男孩James Phipps身上，然后再给他接种天花患者的分泌物，小男孩竟然没有被感染。这个故事反映了获得性免疫的两大特点，即特异性和记忆性。在人体内，执行特异性免疫功能的专职免疫细胞有两类，即T细胞和B细胞，它们的共同特征是不仅能够特异性识别和杀伤某一种病原体（如天花病毒），而且能够记住这种病原体的特征，如果下次再遇到同样的病原体即可有针对性地发动一场“歼灭战”。这就是为什么患天花之后患者能获得终身免疫。

后来，免疫学家研究并弄清楚了在小男孩体内起保护作用的物质，除了T细胞外还有血液中一类特定的免疫球蛋白，并命名为抗体。这些抗体是由B细胞产生的，诱导B细胞产生抗体的物质称为抗原。产生抗体的过程大致如下：B细胞是抗体的制造工厂，其表面分布着许多抗体分子（也称为B细胞受体）。当

遇到抗原时，B 细胞表面的抗体分子首先与抗原结合，之后 B 细胞被激活，细胞体积变大并进行分裂增殖，最终成熟为浆细胞，浆细胞可产生大量的抗体并释放到血液和组织中结合并清除病原体。

有趣的是，每一个 B 细胞只产生一种抗体，每一种抗体只识别一种特定的抗原表位。例如，识别乙肝病毒的抗体，不结合禽流感病毒等其他病原体。那么，我们机体需要储备多少种抗体才可能抵御自然界成千上万的病原体呢？免疫学家做过粗略估计，大约需要 1 亿种抗体分子。然而，人类基因组中目前发现的全部基因还不足 30 000 个，即使全部用于编码抗体也不能满足。那么，如此众多的抗体是如何产生的呢？在解答这个问题之前，我们需要先了解抗体分子的结构组成。

抗体是一类结构相似、功能专一的特殊蛋白质。它是由两条完全相同的重链和轻链组成的异源四聚体（图 1）。无论是抗体分子中的重链还是轻链都具有两个功能区，即可变区和恒定区。可变区决定每个抗体识别抗原的特异性。在每个可变区里，有三个部位的氨基酸序列变化非常大，称为高变区。正是由于这个区域氨基酸序列和结构的多样性，使不同抗体具有了结合不同抗原的结构基础。抗体的恒定区氨基酸序列相对保守，与抗体的识别功能无关，主要决定抗体的类型。例如，根据重链恒定区的不同，可以将抗体分为 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgE、IgD 九种类型。

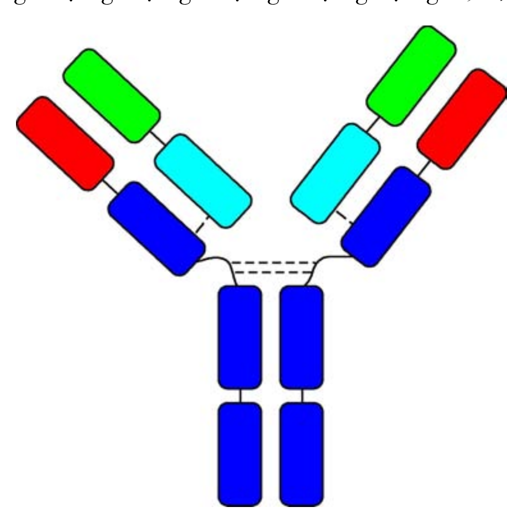


图 1　抗体结构示意图

抗体重链包括可变区（红色）和恒定区（蓝色）。抗体轻链包括可变区（绿色）和恒定区（浅蓝色）（图片引自 http：//www．cartage．org．lb/en/themes/mainpage．htm）

自从 19 世纪抗体首次被发现以来，科学家一直在努力回答这样一个问题，如此种类繁多的抗体是如何产生的呢？

1957 年澳大利亚免疫学家 Burnet 提出了克隆选择学说，认为一种成熟的 B 细胞只能产生一种抗体，而抗原起到了选择某一种 B 细胞克隆的作用。机体存在种类繁多的 B 细胞，当特定抗原侵入时，与一种特定的 B 细胞结合，使得这种 B 细胞激活并大量增殖。由于这群 B 细胞来源于一个克隆，它们分泌针对同一个抗原的抗体。尽管这一学说得到了实验结果的支持，但无法解释为什么哺乳动物有限的基因数量能产生数以亿计的抗体种类。

随后，Burnet 又提出了体细胞突变假说，认为在个体胚胎发育的早期，大量体细胞中的抗体基因发生了突变，这种基因的突变最终导致了抗体的多样性。然而，体细胞中抗体基因为什么会有这么高的突变率？20 世纪 60 年代，美国加州理工学院的 Dreyer 和 Bennett 从抗体的结构出发，试图对抗体多样性给予解释。他们提出了体细胞重组学说，认为在生殖细胞中，存在大量的 V 区基因和少数 C 区基因，在 B 细胞成熟的过程中，染色体发生了重排，多个 V 区基因中的一个和 C 基因组合，产生完整的抗体基因。这种理论虽然能够解释产生抗体多样性的原因，但缺乏实验结果的支持。

1976 年，日本科学家利根川进（Tonegawa）等用实验证实了体细胞重组是通过抗体基因重排实现的。1982 年 Hood 和利根川进等又在抗体重链基因中发现了多样性基因（diversity），简称为 D 基因，它编码高变区的氨基酸。至此，体细胞重组学说得到了实验的证实，从根本上回答了抗体多样性产生的物质基础与机制。利根川进也因此荣获了 1987 年诺贝尔奖。

根据抗体基因重排理论，我们不难理解抗体的多样性。在人 B 细胞中，编码抗体重链的基因是由 V、D、J、C 四种基因片段组成，每种基因片段以多个拷贝形式存在。组成抗体重链的 V 片段基因有 65 种，D 片段基因有 27 种，J 片段基因有 6 种，C 片段基因有 9 种。每一个 B 细胞是通过随机选择 V、D、J、C 片段基因中的一种并将其组装成一个完整的抗体重链基因。根据排列组合，我们不难算出抗体重链的可能种类约有 95 000 种（65×27×6×9）。组成抗体轻链的 V 片段基因有 40 种，D 片段基因有 5 种，J 片段基因有 30 种，C 片段基因有 4 种。排列组合后轻链的可能种类可达 24 000 种（40×5×30×4）。由于每个抗体都是由两条相同的重链和两条相同的轻链组成，所以最终可产生的抗体种类多达 1 亿种。

有趣的是，科学家发现在鸡的抗体基因组中，只含有一个 V 和 J 基因片段，以及 15 个 D 基因片段，然而鸡的抗体非常多样，这显然不是通过有限基因片段的重组完成的。随着研究的深入，科学家发现在 B 细胞染色体（包含 V、D、J 基因片段的区域）里会发生相当高的突变率，称为体细胞高频突变（somatic hypermutation）。通常人体细胞中 DNA 整体突变率是相当低的，每 1 亿个碱基中大约仅有一个会发生突变。然而在 B 细胞中，大约每 1000 个碱基中就有一个发生突变，大约是自然发生基因突变概率的 10 万倍。为什么只在 B 细胞中发生基因高频突变呢？原来 B 细胞中表达一类引发高频突变的脱氨基酶（activation-induced deaminase，AID），这类酶仅在 B 细胞中表达。在 B 细胞成熟过程中，AID 能随机脱去抗体 V 区基因中 C 碱基上的氨基，从而将 C∶G 碱基对转变成 U∶G 碱基对。由于 U∶G 碱基对在空间上无法配对，在染色体中无法稳定存在。因此在细胞中多种酶的作用下，U∶G 碱基对会被修正为 U∶A 碱基对，并

进一步转变为 T∶A 碱基对。这也解释了为什么在 B 细胞成熟过程中 C∶G 碱基对的突变概率要远远大于 A∶T 碱基对。

另外，抗体的多样性也来源于抗体的类型转换（isotype switch）。前面已经提到，根据抗体重链恒定区的结构不同，可以将其分为九种类型。在免疫反应的初期，B 细胞产生大量默认的、亲和力较低的抗体类型—— IgM，随着免疫过程的进展，B 细胞将其产生的 IgM 转换成 IgG、IgA、IgE 中的任何一种。这不仅大大提高了抗体的多样性，而且也提高了抗体的高亲和力。

最后，我们只能感叹大自然巧妙地应用了体细胞重组、高频突变和抗体类型转换，利用少数基因片段制造出数量巨大、丰富多彩的抗体。然而，关于抗体多样性产生的原因仍有待完善。例如，为什么高频突变只是发生在抗体可变区的基因中？为什么这种高频突变不被细胞中存在的 DNA 修复系统及时修复？这些问题依然是个谜。

参 考 文 献

David Jung. 2006. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. Annu Rev Immunol,24：541～570

Ephraim S Tang，Alberto Martin. 2007. Immunoglobulin gene conversion：synthesizing antibody diversification and DNA repair. DNA Repair,I557～I571

Li ZQ，Caroline J Woo，Maria D Iglesias-Ussel，et al. 2004. The generation of antibody diversity and class switch recombination. Genes Dev,18：1～11

Michael S Neuberger. 2008. Antibody diversification by somatic mutation：from Burnet onwards. Immunology and Cell Biology，86：124～132

Muyldermans S. 2009. Camelid immunoglobulin and nanobody technology. Veterinary Immunology and Immunopathology，128：178～183

Papavasiliou Nina,David G Schatz. 2002. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes：merging mechanisms for genetic diversity. Cell，109：S35～S44

撰稿人：阎锡蕴
中国科学院生物物理研究所

抗体亲和力成熟的机制是什么

What Is the Mechanism of Antibody Affinity Maturation

抗体亲和力（antibody affinity）是指抗体与其抗原相结合的紧密程度，亲和力越强，则抗原与抗体的结合越牢固，它是用以评价抗体性质最重要的指标之一。1936 年，在 Landsteiner 的划时代专著《血清学反应的特异性》中，阐述了免疫系统如何产生针对各种外源物质的特异性抗体，但是直到 1965 年，Siskind 和 Eisen 才详细报道了血清中的抗体亲和力随免疫时间延长而逐渐提高的现象。1969 年，Siskind 和 Benacerraf 将这种现象称为抗体亲和力成熟，而抗体的亲和力是如何提高的，其调控机制是什么？这些至今仍然是免疫学研究中未解决的难题。Brenner 和 Milstein 提出解释这一现象的突变理论假说，认为一个未知的靶向机制介导特定抗体基因的 DNA 切割，随后经错配修复产生突变。1970 年，Weigert 等首次在蛋白质水平比较研究小鼠轻链差异性时，发现了抗体基因的超突变（hypermutation）现象，他们认为突变的轻链来自于同一个胚系基因，突变不是随机分布的，而是集中在抗原结合位点。

随着现代分子生物学技术的发展，Bernard 和 Griffiths 等在研究中发现，抗体亲和力的改变与 DNA 的突变相关，从而开始了突变的分子机制研究。1987 年，Berek 和 Milstein 等认为，在人免疫系统中，高亲和力抗体的产生是 B 细胞在抗原的反复刺激下，经过胚系可变区基因重排、体细胞突变（somatic hypermutation，SHM）及 B 细胞的选择性增殖而实现的。B 细胞形成的早期，在 DNA 重组激活基因 RAG1/RAG2（recombination activation genes，RAG1/RAG2）的作用下，抗体的 V（D）J 基因发生重排，形成初级细胞库。基因重组后的细胞在次级淋巴器官中增殖并形成生发中心，经体细胞突变和克隆选择两个过程导致抗体的亲和力成熟。

体细胞突变是如何发生的？免疫细胞识别抗原之后，其受体与抗原表位结合，使 B 细胞活化并激活相关基因的表达，合成和分泌生物活性物质，其中包括特异性的核酸酶，识别靶 DNA 并形成双链缺口（double strand break，DSB），然后在错配修复酶的修复过程中产生突变。但是核酸酶是如何选择作用靶点的呢？2002 年，Arakawa、Harris 和 Muramatsu 等发现激活诱导脱氨酶（activation induced cytidine deaminase，AID）在 SHM 和抗体类型转变（class switch recombination，CSR）中起重要作用。AID 引发 DNA 中的胞嘧啶脱氨基形成尿嘧

啶的碱基置换过程。突变后 C∶G 碱基对突变并发生错配形成 U∶G 碱基对。尿嘧啶一般在 DNA 序列中不存，为了维持基因组的稳定性，尿嘧啶被尿嘧啶-DNA 转葡糖基酶切除，DNA 错配修复蛋白和跨损伤 DNA 合成（translesion DNA synthesis，TLS）聚合酶发生作用，修补缺失并产生突变。Rada 和 Milstein 等发现，可变区基因的启动子在突变过程中发挥重要作用，距离启动子越远，突变几率越小；启动子敲除后，突变消失。但是，Betz 等的研究未得到相同的结果。2000 年，Papavasiliou 和 Schatz 等研究发现了基因的增强子在突变中的作用。他们认为启动子决定突变的区域，增强子决定突变的位点，但它们的作用方式有待深入研究。1992 年，Rogozin 和 Kolchanov 等首先发现基因中超突变的热点（hot spots）区域，如核酸基序 RGYW，主要位于抗体的抗原识别区域，即抗体的互补决定区（complementarity determining region，CDR）。体细胞中每代每个碱基突变的频率约为 10^{-3}，比自发突变频率高 10 万倍。轻、重链可变区基因共约 600 个碱基，根据上述突变频率，细胞每分裂一两次，就会引入一个突变。目前我们还未知可变区基因的突变频率为什么会比其他基因高出很多，但已确认，基因的超突变与核酸序列有关，而且受相邻序列的影响，但是细胞中非抗体基因却未发生同样频率的高突变。

B 细胞经过体细胞突变后，先转移至动脉周围淋巴鞘（periarteriolar lymphoid sheath，PALS）附近，这时 B 细胞开始分泌 IgM，随后产生类型转变的抗体，在生发中心的滤泡中为有限的生存几率而竞争，包括对抗原的争夺。B 细胞的转移可能与细胞表面的趋化因子受体有关，但其转移的具体机制不是十分清楚。B 细胞竞争结合生发中心的滤泡树突状细胞（follicular dendritic cell，FDC）上的抗原，其中只有那些具有最高亲和力的 B 细胞能够获取抗原，才能存活并增殖；那些经体细胞突变而产生的丧失抗原识别能力的 B 细胞和低亲和力 B 细胞或识别自身抗原的 B 细胞，在细胞表面受体的介导下，诱发细胞程序性死亡而被巨噬细胞吞噬。离开生发中心并进入记忆细胞库（memory pool）中的 B 细胞的选择过程，可能对抗体亲和力成熟也十分重要，但对其机制至今仍知之甚少。

体细胞突变后产生不同亲和力的 B 细胞，那么分泌高亲和力抗体的细胞是如何筛选的呢？科学家提出了克隆选择假说。克隆选择假说是由免疫学家 Niels Jerne 在 1955 年首先提出，并经 David Talmadge 和 Frank Macfarlane Burnet 进行修改，1957 年又由 Burnet 做了完整的阐述。体内的造血干细胞经过分化和基因重排，产生许多未成熟的淋巴细胞克隆，每一个克隆能识别不同的抗原决定簇并与之发生反应，抗原特异性淋巴细胞克隆能在接触抗原之前独立产生而不依赖抗原。生发中心的 B 细胞具有独特的程序性死亡趋向特征，而且这一事件在体细胞突变发生前已经开始，这些细胞如果没有抗原的刺激就开始快速程序性死亡，这一现象与它们高表达程序性死亡诱导基因相一致。这些基因包括 c-myc、p53、Bax 和 Fas 等，而缺

少存活基因 Bcl-2 的表达。高表达的 c-myc 基因，不仅诱发生发中心的 B 细胞高速增殖，也是诱导其程序性死亡的主要因素 。这一特性构成了体细胞突变后阳性选择分子机制的基础。体细胞突变产生的、具有低亲和力抗原受体的细胞，因不能竞争得到滤泡树突细胞上的抗原而诱发程序性死亡 ；而具有高亲和力抗原受体的细胞，能够优先与抗原结合，并将抗原加工提呈给生发中心的 T 细胞，激活它们并释放 CD40 配体和 Fas 配体。CD40 配体增强了 B 细胞对 Fas 配体诱导的程序性死亡敏感性。滤泡树突细胞不仅提供适量的抗原表位刺激高亲和力的 B 细胞，而且具有看护细胞 （nurse cell）的功能。滤泡树突细胞上的补体 C3 （如 C3d） 可通过与 B 细胞的 CD21 结合，促进 B 细胞的存活与增殖。

目前已经知道体细胞中点突变的可能机制，但是对插入突变和缺失突变的机制研究还较少。体细胞的超突变为什么发生在抗体的可变区基因，而不是抗体的其他部位，更不是同一个细胞中的其他基因，以及生发中心的 B 细胞分裂速率比体内其他细胞快的原因，这些都是免疫学研究的难点。

参 考 文 献

Darren MP, Daniel G, Yaneer BY, et al. 1997. Somatic evolution in the immune system :the need for germinal centers for efficient affinity maturation. J Theor Biol ,186 : 159～171

Edward JS. 2009. Mechanism of somatic hypermutation : critical analysis of strand biased mutation signatures at A :T and G :C base pairs. Mol Immunol ,46 : 305～320

Grace T, Papavasiliou FN. 2007. Immunoglobulin somatic hypermutation. Annual Rev Gen ,41 : 107～120

Javier MD, Michael SL. 2007. Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. Annual Rev Biochem ,76 : 1～22

Liu YJ, Odette DB, Isabelle FV. 1997. Mechanisms of selection and differentiation in germinal centers. Current Opin Immunol ,9 : 256～262

Norman RK. 1996. The "clonal selection hypothesis" and current concepts of B cell tolerance. Immunity ,5 : 189～195

Nossal GJ. 1992. The molecular and cellular basis of affinity maturation in the antibody response. Cell ,68 (1) : 1～2

Papavasiliou F N, David G S. 2002. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes : merging mechanisms for genetic diversity. Cell ,109 : S35～S44

撰稿人 :朱 进[1] 冯振卿[2]

1 南京军区军事医学研究所

2 南京医科大学

如何确定抗体治疗的有效靶位

How to Identify Functional Targets for Antibody-Based Therapy

抗体分子作为具有多种生物效应的蛋白质分子，在疾病的诊断和治疗方面具有重要的意义，并已经越来越引起人们的关注。从 1986 年第一个治疗性抗体上市，到今天治疗性抗体年销售额突破 300 亿美元而成为整个生物制药领域的中坚力量，治疗性抗体目前正以更加令人振奋的势头向前发展。目前美国 FDA 已批准 34 种治疗性抗体上市，我国 SFDA 也已批准 16 种治疗性抗体，这些抗体在临床上已被成功用于恶性肿瘤、自身免疫性疾病、感染性疾病及移植排斥反应等的治疗。

治疗性抗体的基本作用机制就是抗体特异性地识别并结合在疾病发生发展中起重要作用的抗原靶点，产生阻断、中和、调理、杀伤、诱导程序性死亡、干扰信号转导等作用，从而发挥其疗效。因此，抗体治疗的关键是寻找在重大疾病中发挥关键作用的分子，并以其为靶点开发治疗性抗体。治疗性抗体的高速发展与药物新靶点的发现有着密不可分的关系。目前治疗性抗体的靶点主要包括 CD3、CD6、CD11、CD20、CD25、Her-2、TNF-α、VEGF 及 EGFR 等，以这些靶点开发的代表性的治疗性抗体有：抗 CD20 单抗 Rituxan（B 细胞淋巴瘤）、抗 Her-2 单抗 Herceptin（乳腺癌）、抗 TNF 单抗 Humira（类风湿关节炎）、抗 VEGF 单抗 Avastin（结肠癌、肾癌等）、抗 EGFR 单抗 Erbitux（结直肠癌）。这些治疗性抗体在临床应用中虽然已表现出一定的疗效，但是单独应用缓解率低、适应证有限，疗效并不够理想。因此寻找更为有效、更为理想的靶点已成为抗体治疗的首要问题；同时对于已确定的有效靶点，鉴定其新的功能表位以提高现有抗体的疗效也具有重要的意义。

1. 筛选鉴定抗体治疗新靶点

传统的治疗靶点基本上是在各个团队的独立研究中发现并进一步开发出治疗性抗体的，寻找到理想的治疗靶点具有偶然性，难度大、周期长。然而，现今国际上新药研究领域呈现出一个显著的特点，即生命科学前沿技术如功能基因组学、蛋白质组学和生物信息学等与药物研究的交叉结合日益密切，且以发现和验证新型药物靶点作为主要目标。据统计，目前发现的治疗性药物的作用靶点有近 500 个，其中 80% 以上都是蛋白质。同时，有预测认为人类基因组中可用于疾病治疗的靶点有 3000～10 000 个，因此还有大量的靶点有待于发现。一些新兴的

学科和技术的发展，包括基因组学技术、蛋白质组学技术、高通量筛选技术、计算机辅助药物设计和生物信息学等，使大规模、高通量地发现功能蛋白和药物靶点成为可能，使药物的发现由偶然走向必然。

理想的抗体治疗靶点在疾病细胞中选择性表达或高表达，而在正常细胞中不表达或者低表达，并且在疾病发生、发展过程中起到关键的功能。对差异表达基因及蛋白质的筛选，主要采用基因组学和蛋白质组学技术。基因组学飞速发展，带来了生物芯片和测序技术的不断突破。生物芯片技术，尤其是 DNA 芯片，在药物靶点发现和药物作用机制研究中应用最为广泛。目前第三代测序技术除了能检测基因表达差异，还能提供突变、新基因和新 SNP 的发现与鉴定。在癌症基因组学研究中，转录组/基因组测序已被应用于抗体靶点的筛选和鉴定。

继基因组学之后，蛋白质组学在抗体治疗靶点筛选上展示出更大的潜能。抗体治疗的靶点主要是蛋白质，其中包括疾病相关/特异性蛋白质、生物标志物和信号转导分子。应用蛋白质组学筛选抗体治疗靶点的基本策略是对健康及疾病的蛋白质组进行比较，通过其核心技术——双向电泳-质谱-生物信息学分析，观察健康与病变组织、细胞或体液的蛋白质表达谱差异和表达量变化。蛋白质组学已成功用于肿瘤、糖尿病、艾滋病、关节炎等多种疾病相关蛋白或标志物的检测，成为抗体治疗新药靶筛选和鉴定的有力工具。

基因组学和蛋白质组学技术虽然为抗体治疗药靶的筛选和鉴定提供了一个新平台，但是仍存在很多不足之处，例如芯片技术的假阳性/假阴性、质谱检测的分辨率问题、生物信息学分析的可信度等，因此对于候选的靶点，需要开展大量的细胞分子生物学实验进行验证，最终确定具有生物学功能的靶点并进行治疗性抗体的开发。

2. 针对已知靶点开发新的功能表位

确定抗体治疗的有效靶点，不仅仅包括发现新的功能性蛋白抗原，还包括开发已知靶点的新的功能表位。表位（抗原决定簇）是指抗原分子中被相应抗体或抗原受体识别的特定部位，由抗原表面几个氨基酸残基组成的特殊序列及其空间结构，是抗原特异性的基础。一般来说，位于抗原蛋白质表面的表位易与抗原识别受体或抗体结合，称功能性表位。蛋白质分子一般均由多个具有不同甚至相反功能的结构域构成，每个结构域表面均存在潜在的功能性表位，不同的表位特异性抗体分别结合至其对应的表位上，可能产生多种生物学效应，包括更强的结合活性、更强的封闭阻断信号通路作用，甚至会出现相反的激活功能。因此，基于一个功能明确的靶抗原，可以开发出多种结合不同功能表位的治疗性抗体。这一策略具有很多优势，首先靶点具有较全面的研究基础，其次开发投资少、见效快，同样这也是一种创新。

开发新的功能表位，最基本的策略就是制备大容量的抗体库或设计功能表位

多肽免疫原制备抗体，并结合表位确定技术和生物学实验进行筛选鉴定，这一过程中最为重要的就是表位确定技术。随着基因工程技术和蛋白质组学研究的进展，目前已有多种方法可用于确定抗体与抗原的结合表位，其中包括竞争检测技术、分段表达鉴定技术、合成肽库技术、质谱鉴定技术、结构生物学和生物信息学技术等。

竞争检测包括竞争性 ELISA、BiaCore 等方法，可检测识别同一分子的不同配体是否识别多个表位，但不能精确定位，根据检测分子的不同（天然或变性蛋白），竞争检测可以确定配体识别的是线性表位还是构象表位。分段表达技术是指利用基因重组技术，表达部分抗原片段来鉴定表位。分段表达可以精确确定线性表位；如果构象表位存在于表达片段中，则可粗略地鉴定构象靶点（50～200 个氨基酸残基）。对于未知结构的蛋白质常常需要进行二级结构预测，再根据预测的结果进行分段表达，然后将表达产物与抗体结合，即可以判断出该抗体的大致表位。合成肽库技术是根据蛋白质的氨基酸序列交替合成 5～7 个氨基酸组成的小肽，然后用 ELISA、BiaCore 等方法鉴定抗体与其结合，这一技术又叫 Pep-Scan。阳性肽即为线性表位，适用于线性表位的精确鉴定。质谱技术既可以鉴定线性表位，也可以鉴定构象表位。通过将抗体固相化后结合靶抗原，再进行柱上酶切，洗脱后可获得抗原表位肽，后用串联质谱进行鉴定，确定其表位序列。结构解析是进行表位确定最为精确的方法。应用 X 线晶体衍射、同步辐射、磁共振等方法，可以直接分析抗原抗体复合物的空间结构，并确定两者的相互作用界面，从而获得最为精确的抗原表位。多种表位确定技术的联合应用更能提高表位确定的精确度。确定抗原的功能性表位，既有助于我们更深入地了解该抗原的结构和功能，也为我们进行新功能表位抗体的筛选鉴定提供了理论支持和技术平台。

目前针对 Her-2、EGFR、VEGF 等重要靶点，已开发出多种新功能表位抗体，在体外及体内实验中表现出更高的亲和力和更强的生物学效应 。但是许多靶抗原可能由于自身结构简单，功能性表位很少，难以用于新表位抗体的开发。同时，对有些抗原的结构及功能研究不够深入，也为新表位抗体的研发带来了困难。

总之，寻找并确定抗体治疗的有效靶点仍是全世界治疗性抗体研发的首要问题，新靶点的发现将有助于我国生物制药产业尽快缩短与世界先进水平的差距，具有重要的战略意义。虽然现阶段抗体靶点的筛选确定依然存在许多亟待解决的难题，但是我们相信随着人类对疾病的发生、发展及抗体治疗分子机制的认识不断深入，将会出现更多的、疗效更好的治疗性抗体，为人类的健康保驾护航。

参 考 文 献

Coughenour HD, Spaulding RS, Thompson CM. 2004. The synaptic vesicle proteome: a compar-

ative study in membrane protein identification. Proteomics, 4: 3141～3155

Fan X, She YM, Bagshaw RD, et al. 2005. Identification of the hydrophobic glycoproteins of *Caenorhabditis elegans*. Glycobiology, 15: 952～964

Gerber HP, Senter PD, Grewal IS. 2009. Antibody drug-conjugates targeting the tumor vasculature: current and future developments. Mabs, 1: 247～253

Lu M, Faull KF, Whitelegge JP, et al. 2007. Proteomics and mass spectrometry for cancer biomarker discovery. Biomark Insights, 2: 347～360

Navarre C, Degand H, Bennett KL, et al. 2002. Subproteomics: identification of plasma membrane proteins from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Proteomics, 2: 1706～1714

Oh P, Li Y, Yu J, et al. 2004. Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy. Nature, 429: 629～635

Stern M, Herrmann R. 2005. Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise. Crit Rev Oncol Hemato, 54: 11～29

Waldmann Thomas A. 2003. Immunotherapy: past, present and future. Nature Medicine, 9: 269～277

Watarai H, Hinohara A, Nagafune J, et al. 2005. Plasma membrane-focused proteomics: dramatic changes in surface expression during the maturation of human dendritic cells. Proteomics, 5: 4001～4011

Zhao Y, Zhang W, Kho Y, et al. 2004. Proteomic analysis of integral plasma membrane proteins. Anal Chem, 76: 1817～1823

撰稿人:陈志南　廖成功

第四军医大学

人源化抗体的修饰与优化

Modification and Optimization of Humanized Antibody

自1975年Kohler和Milstein创立杂交瘤技术以来，单克隆抗体作为一种新型生物制剂在人类疾病的预防、诊断及治疗方面已显示出重要作用。然而，杂交瘤技术制备的单抗多为鼠源性，属于异种蛋白而具有免疫原性，故在人体内重复应用时可产生不同程度的人抗鼠抗体（HAMA）反应，从而削弱其治疗的有效性，并对清除抗体的器官产生损害。另外，鼠源性单抗在人体中常不能有效地激活补体和Fc受体相关的效应系统，因此其应用受到较大限制。为了克服上述问题，人们根据抗体结构与功能之间的联系，在保持原单抗特异性和亲和力的基础上，利用不同的策略对鼠单抗进行了程度不同的人源化改造（图1）。

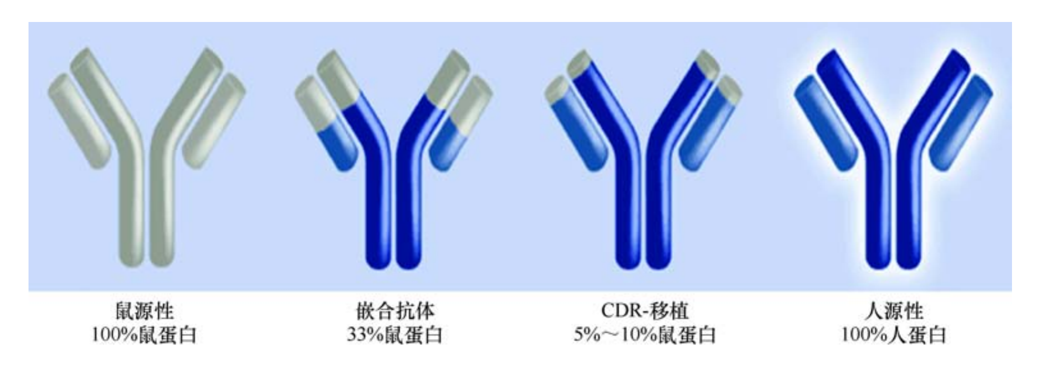


图1　不同改造形式抗体的人源性比例比较

鼠抗体人源化改造的研究主要经历了3个阶段：第1代抗体人源化改造是将鼠单抗的可变区和人抗体的恒定区组装成嵌合抗体，由于这两部分在空间结构上相对独立，其独特的抗体亲和力保持得很好。但因鼠单抗可变区的存在，应用时仍有较强的HAMA反应。第2代抗体人源化改造是在嵌合抗体的基础上进一步将鼠单抗可变区中相对保守的FR区替换成人的FR区，只保留与抗原结合的CDR部位（即CDR移植），这是真正意义上的人源化抗体。该种抗体又称为CDR移植抗体或改型抗体。第3代抗体人源化改造是利用噬菌体抗体库技术，通过链更替将鼠单抗Fab片段转换成完全人源性抗体，这种形式的抗体由于具有100%的人抗体序列，因此从根本上克服了HAMA反应的出现，属于鼠抗体

人源化的最理想方式。

不管在抗体人源化改造中采用上述何种方案，都必须遵循下面两个基本原则：一是应保持抗体的亲和力和特异性，尤其不能丧失抗体特异结合抗原的能力。二是应降低或基本消除抗体的免疫原性。下面对 3 种抗体改造形式分别予以介绍。

1. 嵌合抗体

由于 90% HAMA 反应是针对鼠抗体恒定区的，因此设计用人抗体的恒定区替代鼠抗体的恒定区，可能使鼠单抗的免疫原性明显减弱。1984 年，Morrison 等首次报道从杂交瘤细胞中获得鼠抗体可变区基因，克隆到重组了人抗体恒定区基因的表达载体中，转染哺乳动物细胞，成功表达出抗半抗原磷酸胆碱（phosphocho1ine，PC）的全分子人鼠嵌合抗体，开创了抗体人源化改造的先河。近年来，嵌合抗体发展十分迅速，并已成为抗体应用研究中的一个重要领域。

2. 人源化抗体

嵌合抗体在某些情况下并不能完全解决 HAMA 反应问题。为此，Winter 博士及其同事将鼠源性抗体可变区中具有抗原结合功能的 CDR（complimentary determination region）区移植至人类抗体可变区中的 FR（framework region）区内，建立了功能性人源化抗体的概念。自此以后，数个不同的研究机构都成功地建立和改进了人源化抗体的设计和构建方案。免疫球蛋白结构的保守性、种属之间的功能相似性及分子模建方法的建立都大大提高了抗体人源化的成功率。另外，通过每一次抗体成功人源化后所获得的知识积累，使人们在制备某一抗体之前，准确地预测抗体人源化的关键残基成为可能。而这一点对于成功地进行抗体人源化具有至关重要的意义。

3. 人源性抗体

噬菌体抗体库技术问世后，Jespers 等报道了利用表位导向选择法对鼠单抗进行人源化，从而制备完全人源性的抗体。其要点为：首先保留异源单抗的轻（重）链，用特定的抗原体外筛选它与人抗体重（轻）链抗体库组合成的杂合抗体库，从中找到维持原抗体活性的人抗体重（轻）链；然后再以选出的重（轻）链为基础，同样从人抗体轻（重）链库里筛选出合适的轻（重）链，并组合成具有原单抗活性的完全人源化的单抗。这个方法的优点是可以获得完全的人源抗体，并可同时获得多种突变株，以利于挑选适于大量表达的单抗株和后期治疗性应用。但与 CDR 移植相比，但该法成功率不高，所获抗体性能也难以得到保证。该方法通常会导致识别特异性的变化。很多实验表明，VH 及 VL 的 CDR3 上的细小差别会影响抗体的特异性，可导致抗体结合到同一抗原的其他表位上。最近 Rader 等报道在类似上述表位导向选择法中，将所有的人重链和轻链可变区基因库中的 CDR3 用亲本鼠单抗的 CDR3 取代再进行筛选，得到了性能良好的人源抗体。此法的普遍可行性如能得到证实，当有较好的应用前景。

上述 3 种方案在构建人源化抗体时可以参考，但对某一具体鼠 MAb 进行人源化时必须具体情况具体分析。另外，与嵌合抗体相同，在人源化设计时，以临床治疗应用为主的免疫球蛋白亚类选择应以 IgG1 或 IgG3 为好，因为它们的 Fc 结合能力和补体固定及 ADCC 效应较好；如果是进行受体封闭或用作导向分子，则以不太活泼的 IgG2 为佳。

在近年美国 FDA 批准的新药中，工程抗体占了很大比例，已有 100 多种人源化单抗进行了临床试验，其中数十种抗体相关新药得到了应用。目前，抗体的人源化方法还在不断发展和完善。综合、合理应用上述各种方法，对于提高抗体亲和力，减少抗体异源性，并同时兼顾抗体的免疫学活化具有重要作用。另外，针对不同的异源抗体选择合适的人源化途径来构建更适于临床应用的人源化抗体，将为新药的开发和一些顽固疾病的治疗开辟新的路径。

参考文献

Baca M, Presta LG, O'Connor SJ, et al. 1997. Antibody humanization using monovalent phage display. J Biol Chem, 272: 10678～10684

Hasholzner U, Stieber P, Meier W, et al. 1997. Value of HAMA-determination in clinical practice - an overview. Anticancer Res, 17: 3055～3058

Hosono M, Endo K, Sakahara H, et al. 1992. Human/mouse chimeric antibodies show low reactivity with human anti-murine antibodies (HAMA). Br J Cancer, 65: 197～200

Hudson PJ, Souriau C. 2003. Engineered antibodies. Nat Med, 9: 129～134

Kettleborough CA, Saldanha J, Heath VJ, et al. 1991. Humanization of a mouse monoclonal antibody by CDR-grafting: the importance of framework residues on loop conformation. Protein Eng, 4: 773～783

Kohler G, Milstein C. 1975. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, 256: 495～497

Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, et al. 1984. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. Proc Natl Acad Sci USA, 81: 6851～6855

Nagahira K, Fukuda Y, Nasu T, et al. 1998. Construction and expression of a mouse-human chimeric antibody against human tumor necrosis factor-alpha. Immunol Lett, 64: 139～144

Wang Z, Wang Y, Li Z, et al. 2000. Humanization of a mouse monoclonal antibody neutralizing TNF-alpha by guided selection. J Immunol Methods, 241: 171～184

撰稿人：邢金良

第四军医大学

如何实现全人抗体库的大规模筛选

How to Screening Antibody by Large-Scale from Fully Human Antibody Library

全人源抗体被认为是治疗性抗体发展的最终方向。人抗体库技术是目前获得治疗性人抗体的重要手段，是 20 世纪 80 年代抗体工程领域的重大进展。1989 年，《科学》杂志首次报道了第一个完整的噬菌体抗体库，至此，人们终于摆脱了体内制备抗体的困境，开辟了体外制备抗体的新天地。人抗体库技术被认为是目前制备人抗体的最快速、简单和经济的方法。继噬菌体抗体库之后，陆续报道了核糖体展示（ribosome display）、细菌展示（bacteria display）、酵母展示（yeast display）等抗体库展示技术，为人抗体体外制备提供了更多的选择，其中，噬菌体抗体库技术是目前最成熟的抗体库形式。人抗体库技术模拟体内免疫系统产生抗体的过程，通过 DNA 重组技术获得全套人抗体（repertoire）可变区基因，并利用各种展示技术实现了抗体基因型和表型的一致，进而通过筛选获得针对某一靶标抗原的特异性抗体基因，并通过体外扩增技术实现特异性抗体基因的富集。抗体库最大的特点在于它的库容量可以达到 10^9～10^{13}，几乎可以涵盖所有的人抗体，理论上可以从大容量人抗体库中筛选到针对任何抗原的特异性抗体。研究表明，库容量与所获得抗体亲和力大体成正比，因此 20 世纪人们一直致力于构建大容量噬菌体抗体库。目前，国际上已经报道了多个大容量全人抗体库，库容量均在 10^9 以上。

全人抗体库的巨大成功颠覆了体内制备抗体的传统和理念，同时也带来了新的问题，即如何获得目标抗体。由于大容量抗体资源库库容量一般高达 10^{10} 以上，而针对某一抗原靶标的特异性抗体可能仅有几十株甚至几株，其中的高亲和力抗体和（或）功能抗体可能更少，目标抗体的筛选可谓大海捞针。形象地讲，我们筛选目标抗体的过程就像是从抗体库的汪洋大海里捕获某一种特殊的鱼。鱼就在那里，而我们要做的是选择合适的位置、合适的时机及合适的渔网和鱼饵，并有足够的耐心和坚持不懈。经过无数次的撒网和捕捞，最终才能捕到它。人们由此提出了人抗体库大规模筛选的概念。如果说大容量抗体资源库是获得目标抗体的前提和基础，那么抗体库的大规模筛选是获得目标抗体的关键。随着人们对疾病发生的机制及分子基础研究的不断深入，越来越多的蛋白质分子对疾病发生的影响及其在疾病治疗中的重要作用将陆续被确认，而这些分子靶标的特异性抗

体将对疾病的诊断和治疗产生积极的影响。因此，需要有快速、便捷的获得靶标抗原功能抗体的通用的技术平台，而抗体库的大规模筛选技术平台为这一问题提供了完美的解决方案。通过抗体库的大规模筛选不仅可以为临床上提供源源不断的治疗性抗体新品种，同时也可以为临床上疾病的快速诊断提供分子佐证。

抗体库的大规模筛选主要指针对同一靶标抗原的特异性抗体的多角度高通量筛选和针对多种靶标抗原的目标抗体的平行筛选。抗体库的筛选主要包括两个过程（图 1）：第一个过程是生物淘选（biopanning），即利用抗原-抗体结合反应对目标抗体进行富集。一般将抗原通过共价或非共价键固定于介质表面，并与抗体库相互作用，通过抗原-抗体结合反应捕获目标抗体，通过洗脱和扩增对目标抗体进行富集，完成一轮筛选，经过 3～5 轮淘选，可实现特异性抗体的有效富集。第二个过程是对淘选后的克隆进行大规模单克隆抗体筛选（screening），一般采用 96 孔或 384 孔微量滴定板进行单克隆 ELISA 分析进行鉴定。鉴定规模一般在 1000 个克隆以上。实现抗体库大规模筛选的关键在于如何实现生物淘选、单克隆筛选及之后的进一步鉴定过程的高通量化。

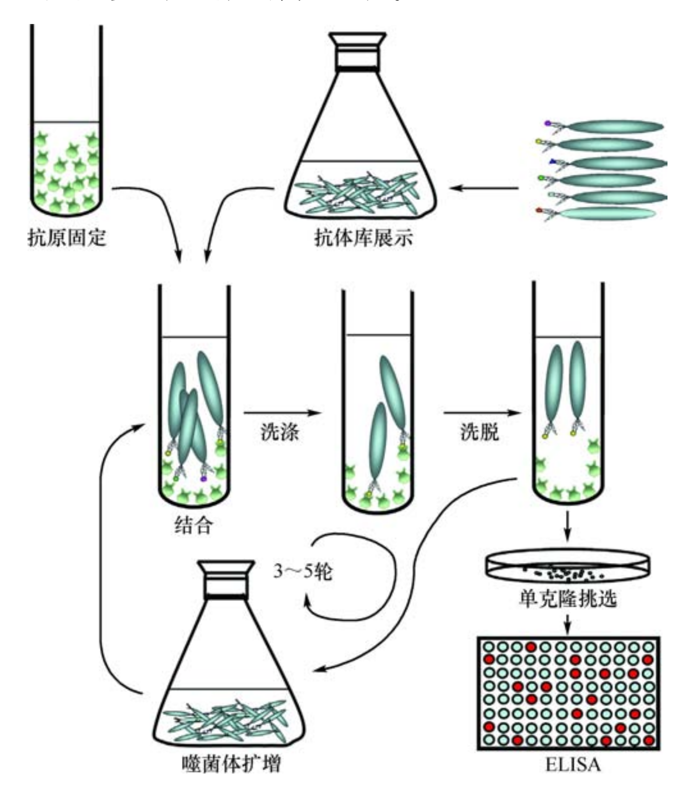


图 1　噬菌体抗体库筛选流程

单靶标抗原抗体的大规模筛选主要体现在第二个环节，即经3～5轮富集后通过对单个克隆的大规模鉴定获得目标抗体。由于靶标抗原往往存在多个抗原表位，而有些抗原表位为优势表位，增加了功能抗体的筛选难度，需要增大筛选鉴定的规模或调整筛选方案以确保获得功能抗体。因此，尽管通过淘选实现了特异性抗体克隆的有效富集，为了保证功能抗体的获得，往往需要对几千甚至上万个克隆进行鉴定，进而通过对阳性克隆进一步甄选获得功能目标抗体。通过96或384孔深孔培养板对大量克隆进行表达，进而通过96或384孔滴定板进行单克隆ELISA分析可以实现高通量的单克隆表达与分析，但是其工作量之大还是令人望而生畏。自动化工作站的引入为抗体大规模筛选带来了生机。自动化筛选工作站一般包括以下几个独立的工作系统：自动化的克隆转移系统、高通量表达系统、ELISA系统、高通量自动分析采集系统。通过工作站可实现高通量的单克隆采集、表达、分析与回收，克隆鉴定量可达到10^4以上。目前，很多大型制药企业引进了类似的自动化工作站，极大解放了人力，但一套工作站往往需要几十万甚至上百万美元的投入，导致了其使用范围的局限性。

人抗体库的大规模筛选还在于如何实现多个抗原特异性抗体的平行筛选。这不仅要求单克隆抗体的鉴定过程实现高通量，同时也要求生物淘选过程的高通量。生物淘选过程的微量化有效解决了这个问题。采用微量滴定板固定抗原或通过将多种靶标抗原固定于膜或芯片表面构建蛋白微阵列，并将其用于抗体库的筛选，可实现数十个甚至上百个靶标抗原特异性抗体的筛选，这种技术为针对包括膜表面抗原或肿瘤细胞相关（或特异性）抗原全人抗体的获得开启了方便之门。目前这种淘选方法已经比较普遍，但同样需要自动化设备的参与才能保证筛选的高效性。

抗体大规模筛选的最终实现需要包括实现抗体基因测序、重组全抗体的类型转换和表达纯化、全抗体的亲和力、特异性及功能鉴定的高通量化。而上述问题的解决将依赖于分子生物学相关技术和自动化技术的进一步发展和完善。比如，蛋白微阵列技术将成为高通量抗体特异性鉴定的有力工具，通量化的表面等离子共振（surface plasmon resonance）技术将使抗体亲和力高通量检测成为可能。由于不同靶标抗原所介导的生物学功能不同，靶标抗体的体内外功能活性大规模分析将是抗体大规模筛选最大的瓶颈问题。然而，无论如何，随着抗体产业研发过程机械化和自动化程度的不断提高，上述问题都将得到不同程度的解决，从而最终实现全人治疗性抗体的快速大规模筛选制备。

参考文献

Buckler DR, Park A, Viswanathan M, et al. 2008. Screening isolates from antibody phage-display libraries. Drug Discovery Today, 13(7/8): 318～324

Hallborn J ,Carlsson R. 2002. Automated screening procedure for high-throughput generation of antibody fragments. Biotechniques ,Suppl : 30～37

Hoogenboom HR , Bruine AP , Hufton SE , et al. 1998. Antibody phage display technology and its applications. Immunotechnology ,4 : 1～20

Hoogenboom HR. 2005. Selecting and screening recombinant antibody libraries. Nature Biotechonology ,23(9) : 1105～1116

Huse WD , Sastry L , Iverson SA , et al. 1989. Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lamada. Science ,246 : 1275～1281

Konthur Z ,Walter G. 2002. Automation of phage display for highthroughput antibody development. Targets ,1(1) : 30～36

撰稿人:王 双 孙志伟
军事医学科学院生物工程研究所

抗体高效表达体系的建立

Establishment of High-Efficient Antibody Expression System

抗体表达载体是指携带有人轻链和重链抗体恒定区序列及供插入可变区序列的限制性内切酶位点的表达元件集合。当其转入真核细胞后即可转录成熟为完整的重组抗体基因的mRNA，同时可进行有效的翻译；其自身的信号肽把翻译指引到内质网（ER），在内质网腔内信号肽被水解；内质网腔的分子伴侣BiP/GRP78和GRP94等协助抗体的折叠、组装并进行有效的分泌。抗体的表达调控属于真核表达的调控范畴，但是也有其特殊的地方。

目前经改造后可用于抗体表达的商业化载体如pCMV-Script、pDual、pCMVTAg1-5、pACUW51、pBAC4x-1等，这些载体相对表达量较低，仅限实验室研究，大都有商业化的专利保护不能用于生产。国外进行高效真核载体研究的机构多为私人公司，关键的技术细节不会透露。国外报道的抗体表达量高达1.0～2.0g/L（大都未用比产物速率计算），达到或超过了单克隆抗体在杂交瘤细胞中的表达水平。究其表达技术，其中很重要的一个方面是对载体中的调控元件已做了大量的研究工作，包括由各种不同元件定向组合而成的载体，优化后的载体使抗体表达水平有了大幅度的提高。其主要特征有真核细胞表达元件包括强启动子、采用抗体的基因组序列、采用了各式各样的选择/加压及优化的染色体整合技术，各种优化后的载体使抗体的表达水平有了较大幅度的提高。

抗体分子在哺乳动物细胞中的表达量亦由以下几个因素决定：载体在染色体上的整合位置、启动子的强度、转录产物的稳定性、mRNA的翻译效率、目的蛋白的折叠效率及目的蛋白的稳定性等。其中前四个因素均与表达载体的设计有关，所以合适的表达载体是决定抗体在哺乳动物细胞中表达量的关键。用PCR或文库筛选的方式获得抗体的cDNA序列或编码基因后，即可选用抗体真核表达载体进行有效的表达。下面将对影响抗体表达的载体元件分解为：

(1) 启动子和增强子：启动子需包含mRNA转录起始点和TATA盒。TATA盒位于转录起始位点上游25～30bp处，是引导RNA聚合酶在正确起始位点转录所必需的序列，即保证转录的精确起始。上游启动子元件常位于TATA盒上游100～200bp，其功能是调节转录的起始频率和提高转录效率。启动子和增强子受细胞类型的限制，在不同的细胞系中有很大不同，因此需根据宿主细胞的类型选择不同的启动子和增强子以便目的基因的高效表达。

（2）抗体基因 5′末端非翻译区：该序列也影响抗体表达，其中研究得比较清楚的是 Kozak 序列，先导序列中 Kozak 序列及第一个 AUG 密码子对于 mRNA 的有效翻译至关重要，抗体基因的翻译效率与先导序列的应用有极大的关系。

（3）信号肽序列的影响：信号肽在蛋白质分泌过程中起重要的作用，信号肽的切割效率对目的基因的表达有一定的影响，如果信号肽的切割效率不高，即使有很高的转录、翻译水平，目的蛋白也无法分泌。所以，对信号肽序列进行优化是一项重要工作。另外，不同的信号肽对于改善 mRNA 翻译起始因子的结合位点空间构象、减少过于复杂的原基因二级结构引起的翻译阻遏效应作用也不同。

（4）可变区序列：大多数抗体在结构和序列上都比较相似，但是在 CHO 细胞（以及其他细胞）中的表达量却相差甚远。这其中首先考虑的是密码子偏性优化，目前已发现抗体信号肽或第一框架区（FR-1 区）中某一氨基酸的改变就可以降低抗体的表达，还有报道重链 CDR 区一个点突变即可以导致抗体不分泌，据推测，这些氨基酸的改变可能极大地影响了抗体正确的空间构象形成，从而改变抗体的稳定性并对其分泌量造成影响。

（5）抗体基因组序列：有多项研究表明，采用基因组 DNA 序列比 cDNA 表达量高。显然基因组序列有利于目的基因 mRNA 在细胞中的正确剪切、加工和提高转录后 mRNA 的稳定性。因此，构建一个通用的抗体基因组序列表达载体是必要的。

（6）终止信号和多聚腺苷酸（PolyA）加尾信号：包含在表达载体中的转录的终止位点控制聚腺苷酸化，并影响 mRNA 的稳定性。

（7）抗体分泌的稳定性：抗体在哺乳动物细胞内的表达成熟遵循了可分泌蛋白在细胞内的表达成熟传输途径。在抗体的合成与分泌过程中有很多步骤、机制都可能会影响到其功能包括抗原结合活性、抗体的组装与分泌等，这些影响因素包括某些重要位点的氨基酸、细胞器滞留信号等。

（8）抗体基因的反式作用因子：PCMV-IE 等用于外源基因表达的启动子都是很强的启动子，但它们起始的转录都是本底的转录。为了提高外源基因的表达量，可以通过一些天然或人工转录激活因子提高上述启动子的转录效率。

（9）实现抗体两条链的表达平衡：当抗体两条链表达不平衡时，不仅带来表达效率上的一种浪费，同时也能降低抗体的表达水平。

提高抗体表达量的策略：限制基因工程抗体在哺乳动物细胞中高效表达的关键因素就是建立一套能表达完整人抗体的表达体系。影响抗体表达量的因素从总体上来看主要有 3 个方面，即抗体表达载体、宿主细胞选择和改造、细胞规模培养和生产工艺。虽然大规模培养条件和无血清及无蛋白培养条件的探索也是与哺乳动物细胞表达系统密切有关的问题，但这是属于另一领域的课题。我们这里只讨论从改造抗体表达载体、宿主细胞选择和改造上来提高抗体的表

达（表 1）。通过改造抗体表达载体来提高抗体的表达量主要包括以下 3 个方面：①利用定点整合到热点位置来提高抗体的表达量；②通过共扩增基因二氢叶酸还原酶或谷胺酰胺合成酶系统来提高抗体的表达；③通过弱化筛选基因来提高抗体表达；④通过在载体中应用其他正向调控元件来提高抗体的表达。

表 1　提高抗体表达的策略

作用因素	提高策略	作用因素	提高策略
转录	强启动子	分泌	适宜的信号肽
	可诱导启动子		轻重链表达平衡
	强转录终止结构		抗体的氨基酸优化
	合适的调控元件		分子伴侣 Bip 等
	合适的抗体基因	整合	热点位置
翻译	翻译型增强子	基因量	弱化筛选标志
	减少稀有密码		可扩增选择基因
	增强蛋白质的稳定性		弱化可扩增选择基因
	增强翻译后修饰		突变可扩增选择基因
加工组装	轻重链表达平衡	其他	宿主细胞修饰
	正确折叠加工		去除非生产克隆
	分子伴侣		合理的基因组装

参 考 文 献

Eissenberg JC, Elgin SC. 1991. Boundary functions in the control of gene expression. Trends Genet, 7 (10): 335～340

Hinrich Boeger DAB, Ralph Davis, Joachim Griesenbeck, et al. 2005. Structural basis of eukaryotic gene transcription. FEBS, 579: 899～903

Levine CG, Mitra D, Sharma A, et al. 2005. The efficiency of protein compartmentalization into the secretory pathway. Mol Biol Cell, 16 (1): 279～291

Makrides SC. 1999. Components of vectors for gene transfer and expression in mammalian cells. Protein Expr Purif, 17(2): 183～202

Schlatter S, Stansfield SH, Dinnis DM, et al. 2005. On the optimal ratio of heavy to light chain genes for efficient recombinant antibody production by CHO cells. Biotechnol Prog, 21 (1): 122～133

Sun Z, Zhou R, Liang S, et al. 2004. Hyperosmotic stress in murine hybridoma cells: effects on antibody transcription, translation, posttranslational processing and the cell cycle. Biotechnol Prog, 20 (2): 576～589

Wakiyama M, Hirao I, Kumagai I, et al. 1993. Effect of tandem repeated AUG codons on translation efficiency of eukaryotic mRNA carrying a short leader sequence. Mol Gen Genet, 238 (1～2): 59～64

Wiersma EJ, Ronai D, Berru M, et al. 1999. Role of the intronic elements in the endogenous immunoglobulin heavy chain locus. Either the matrix attachment regions or the core enhancer is sufficient to maintain expression. J Biol Chem, 274 (8): 4858～4862

撰稿人:李　郁

第四军医大学

如何实现治疗性抗体规模化生产

How to Realize Large-Scale Production of Therapeutic Antibody

抗体（antibody）是生物学和医学领域用途最为广泛的蛋白质分子。现阶段的治疗性抗体（therapeutic antibody）主要是指以哺乳动物细胞为表达系统生产的、针对肿瘤特异性抗原或肿瘤相关抗原、抗体独特型决定簇、细胞因子及其受体、激素及一些癌基因产物等分子靶点发挥药理作用的基因工程抗体（gene engineering antibody）。随着治疗性抗体人源化程度的提高、副作用的减少和疗效的增强，治疗性抗体对肿瘤、自身免疫性疾病、感染性疾病和心血管疾病的独特治疗作用受到人们的普遍认可。与此同时，治疗性抗体临床使用剂量大、生产技术难度高和质量控制要求严的特点促成了治疗性抗体市场呈现供不应求、价格昂贵的局面。治疗性抗体的规模化生产也因此成为现阶段推动生物技术药物产业发展和医疗健康水平提升、尚需进一步发展完善的重大工程技术。

1975 年，Köhler 和 Milstein 首次用淋巴细胞杂交瘤技术制备出均一性的单克隆抗体（monoclonal antibody）。杂交瘤技术的诞生被认为是抗体工程发展第一次质的飞跃，也是现代生物技术发展的一个里程碑。这种单克隆抗体多是由鼠 B 细胞与鼠骨髓瘤细胞经细胞融合形成的杂交瘤细胞分泌的，具有鼠源性，进入人体会引起机体的排异反应。同时，完整抗体分子结构复杂、分子质量较大、生产成本高，不适合大规模工业化生产。20 世纪 80 年代初，抗体基因结构和功能的研究成果与重组 DNA 技术相结合，产生了基因工程抗体技术。基因工程抗体即将抗体的基因按不同需要进行加工、改造和重新装配，然后导入适当的受体细胞中进行表达的抗体分子。自 1986 年第一治疗性抗体药物上市以来，迄今已有 34 个治疗性抗体药品通过美国 FDA 的批准进入市场。2008 年治疗性抗体的全球市场销售额超过 300 亿美元。

治疗性抗体的规模化生产是一个相对的工程技术难题（图 1）。一方面，从目前的生产规模和市场销售看，治疗性抗体药的规模化生产已不存在难以逾越的技术困难；另一方面，来自提高产品质量和降低生产成本的要求，又使治疗性抗体的规模化生产面临技术水平不断提升的压力。完整的治疗性抗体规模化生产技术体系涵盖抗体高效表达细胞系建立、抗体表达细胞大规模培养和抗体分离纯化等生物技术药物制备关键技术平台的系统集成。具体的治疗性抗体规模化生产工艺技术特指抗体表达细胞大规模培养和抗体分离纯化技术的集成与工程应用。治

疗性抗体药规模化生产技术水平和能力的提升，有赖于组成完整治疗性抗体规模化生产技术体系的生物技术药物制备关键技术的突破和技术平台系统集成度的进一步提高。

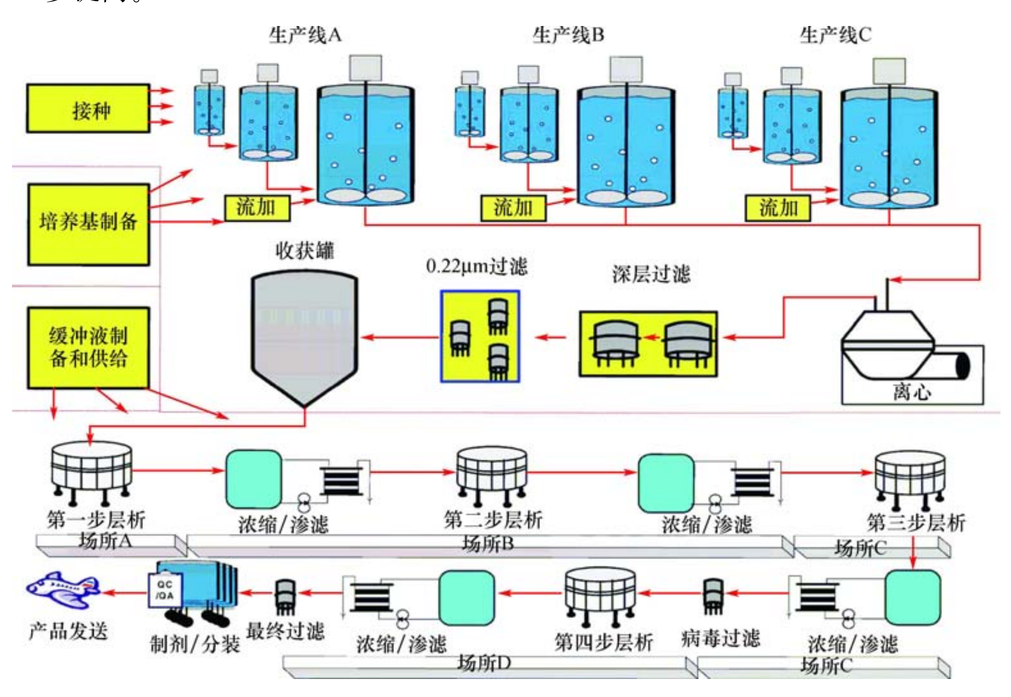


图 1　治疗性抗体规模化生产的工艺技术流程

作为治疗性抗体表达系统的哺乳动物细胞系，其目的产物的表达水平和体外培养生物学性状在很大程度上决定着治疗性抗体生产的能力和成本。影响外源基因在动物细胞表达效率的因素有许多，其中以基因的拷贝数及基因在染色体上的整合位点对外源基因表达的影响最为直接、有效。应用不同调控元件、基因扩增标记、高拷贝稳定整合或低拷贝定点整合于染色体的转录活跃区，是构建高效、稳定表达治疗性抗体工程细胞的主要技术途径。流式细胞分选技术和激光分析与处理（laser-enabled analysis and processing，LEAP）技术可以实现对基因转染细胞抗体表达效率的高通量大规模分选，从而提高获得高效表达治疗性抗体细胞系的几率。

抗体表达细胞的大规模培养是治疗性抗体规模化生产的根本实现途径。在批式流加操作的抗体表达细胞大规模培养工艺中，生物反应器中的细胞密度、活力、代谢和培养时间决定着治疗性抗体的生产效率，也影响着抗体的后续分离纯化和质量控制。细胞培养是一个非常复杂、同时又是动态变化的生物反应过程体系，其中包含着许多相互联系、相互影响的线性和非线性过程变量（process

variables)。这些变量直接影响着细胞的生存、生长和代谢状态。设计和优化具有促进细胞生长、维持细胞存活、提高抗体基因表达作用的化学成分明确的无血清培养基（chemically defined serum-free media)、发展和完善细胞培养过程变量的在线实时监测和即时反馈控制技术、建立和完善基于能有效调节细胞代谢流、干预细胞增殖和程序性死亡的细胞培养过程控制策略是进一步提升治疗性抗体规模化生产效率的关键技术。

抗体的分离纯化是治疗性规模化生产中成本控制和质量控制的关键技术环节。源于哺乳动物细胞生产抗体的不均一性（heterogeneity）和抗体生产过程中衍生异源杂质（宿主细胞蛋白、核酸和潜在病毒污染）的潜在危害性，治疗性抗体的分离纯化面临进一步提升工艺能力（process capacity）和质量控制要求的技术难点与挑战。改进抗体分离纯化介质的理化性状、提高介质的抗体结合能力和分离效率、减少分离纯化步骤，是提升工艺能力和满足质量控制要求的主要技术发展方向。

毫无疑问，治疗性抗体已成为当今生物技术药物研究和产业发展最重要的方向与品种，基因组学、蛋白质组学、代谢组学研究的深入，以及代谢工程、生化工程技术的发展，在不断拓展治疗性抗体的品种和临床应用范围的同时，将迅速地向治疗性抗体规模化生产渗透，推动治疗性抗体规模化生产工程技术的发展。

参考文献

Birch JR, Racher AJ. 2006. Antibody production. Adv Drug Deli Rev, 58: 671～685

Coco-Martin JM, Harmsen MM. 2008. A review of the therapeutic protein expression by mammalian cells. BioProcess Int, 6 (Suppl): 28～33

Dutton G. 2010. Trends in monoclonal antibody production. Gen Eng Biotechnol News, 30: 22～27

Li F, Zhou JX, Yang XM, et al. 2006. Current therapeutic antibody production and process optimization. BioProcessing J, 5: 16～25

Shukla AA, Hubbard B, Tressel T, et al. 2007. Downstream processing of monoclonal antibody-application of platform approaches. J Chromatogr B, 848: 28～39

撰稿人：陈昭烈

军事医学科学院生物工程研究所

治疗性抗体功能增效策略

Strategies for Enhancing Effector Functions of Therapeutic Antibodies

抗体通过阻断抑制、中和作用、抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity，ADCC）及补体依赖性细胞介导的细胞毒作用（complement-dependent cytotoxicity，CDC）等机制发挥功能。然而，抗体的天然效应功能很弱，循环中高浓度 IgG 的存在可干扰抗体与效应细胞表面 Fc 受体（FcR）结合，细胞内复杂的信号相互作用网络、微环境的影响、抗体 Fc 段糖基化的差异或 Fc 受体的多样性、抑制性受体的存在等亦影响抗体的效应功能。虽然治疗性抗体的临床应用已取得了令人瞩目的成就，但是临床实践已使临床医师及研究者冷静地认识到，抗体并非最初期待的“魔弹”，目前尚无一种抗体在治疗中独立应用能够取得令人满意的疗效。

自 20 世纪 80 年代起，抗体研究领域先后开展了一系列抗体增效的研究工作，包括改造抗体 Fc 区及其糖基化形式、抗体的结构、生化特性，以增强抗体的 ADCC 和 CDC 效应，改变抗体的药代动力学特征，增加抗体的结合价，开发出多种多样新一代的抗体分子及携效应分子的新型抗体，如双特异性抗体、免疫细胞因子、抗体-放射性核素偶联物等，使抗体的疗效显著提高。

1. 增强 ADCC 和 CDC 效应

近年来，为了提高治疗性抗体的活性，研究者就如何提高抗体的 ADCC 和 CDC 效应功能进行了大量的研究，并取得了显著的成果。ADCC 是指当 IgG 抗体通过 Fab 段与靶细胞表面抗原决定簇特异性结合后，其 Fc 段可与 NK 细胞表面 FcγRⅢ结合，从而使 NK 细胞对靶细胞产生非特异性杀伤作用。其中 FcγRⅢa 是白细胞受体家族 FcγR 的成员之一，是已知的最主要的激活 NK 细胞 ADCC 效应的受体，目前多种治疗性抗体均具有 ADCC 效应，例如 Rituximab（抗 CD20）、Trastuzumab（抗 Her-2）和 Infliximab（抗 TNF-α）。CDC 是抗体发挥效应的另一种机制，参与了 Rituximab 和 Alemtuzumab 等抗体抗肿瘤过程。人们发现 IgG1 亚型抗体相比其他亚型具有更强的 ADCC 和 CDC 效应，这与其 Fc 区表面黏附的 N-连接二分支复合型寡糖寡糖相关，由此开发了多种提高抗体与 FcγRⅢa 或补体 C1q 结合力的有效方法，从而增强了抗体的 ADCC 和 CDC 效应而使抗体具有更好的治疗活性（图 1）。

提高 ADCC 最有效的手段主要包括改造 Fc 区的氨基酸残基和移除 Fc 区寡糖链中的岩藻糖。通过 Fc 表面可及性分析、计算机分子对接、酵母展示系统等技术进行随机或合理设计，对抗体 Fc 区氨基酸序列进行突变（例如 S239D/S298A/I332E 三个残基定点突变），可以将 Fc 与其受体 FcγRⅢa 的亲和常数提高近 100 倍。许多研究已证明，移除 Fc 区寡糖链中的岩藻糖，也可以显著地增强 Fc 与 FcγRⅢa 的结合，同时并不影响抗体抗原的结合及 CDC 效应。更重要的是，移除岩藻糖完全可以达到突变 Fc 区氨基酸所产生的 ADCC 增强效果，此外，非岩藻糖基化抗体具有更高的免疫学活性，因此制备非岩藻糖基化抗体是增强 ADCC 效应的最有效手段。但是这一技术应用于抗体大规模生产仍存在很大难度，目前 FDA 批准的治疗性抗体基本是岩藻糖基化和非岩藻糖基化抗体的混合物（其中非岩藻糖基化抗体含量低于 10%），这些抗体的 ADCC 效应并不理想。目前，通过基因工程方法阻断岩藻糖基化通路、采用α-1，6-岩藻糖基转移酶（FUT8）基因敲除细胞作为宿主细胞是最为成功的制备非岩藻糖基化抗体方法，应用该技术制备多种 ADCC 效应增强抗体已进入临床研究阶段。

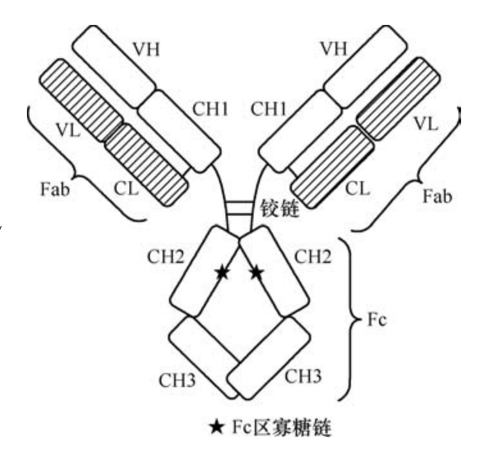


图 1 IgG1 抗体结构及 Fc 区糖基化

Fc 与其受体的结合主要发生于 CH2 结构域，并依赖于共价结合在 CH2 天冬酰胺 Asn^{297} 的寡糖链的糖基化形式

CDC 效应是由血清中一系列的补体蛋白介导的级联反应，这一过程由 C1q 与抗体 Fc 的结合而触发，其结合同样影响着后续的补体激活，因此易化 Fc 与 C1q 的结合可以显著增强抗体的 CDC 效应。已有多项研究报道通过突变 Fc 区或者铰链区氨基酸，提高抗体与 C1q 的结合。由于 IgG1 有最强的 ADCC 效应而 IgG3 有最强的 CDC 效应，将 IgG1 与 IgG3 的重链进行混合重组（complegent 技术），能使抗体同时具有较强的 ADCC 和 CDC 效应，这一技术已应用于抗 CD20 和抗 CD52 抗体（IgG1）的改造，结果表明在不影响抗体 ADCC 效应的前提下，大大提高了 CDC 效应。

可见增强 ADCC 和 CDC 效应是提高治疗性抗体疗效的重要途径之一，但是这一技术推广至临床应用目前还存在很多困难。首先，抗体抗肿瘤具有多种机制，单独依赖 ADCC 和 CDC 效应对于很多实体瘤治疗有效率低，只有深入研究抗体抗肿瘤的机制才能更好地提高抗体的疗效；其次，动物的免疫系统与人类有较大差异，而且大部分肿瘤动物模型具有免疫缺陷特性，无法诱导 ADCC 和

CDC 效应产生，因此研究 ADCC 和 CDC 增强抗体的疗效缺乏理想的动物模型，这大大限制了增强抗体的临床前及临床研究。目前已有研究报道将人类免疫效应细胞导入小鼠体内模拟人类免疫系统、构建人 FcγRⅢ转基因小鼠、采用猴子动物模型等方法进行 ADCC 和 CDC 增强抗体的体内实验，相信不久的将来这类抗体会成为治疗性抗体药物的主流。

2. 双特异性抗体

双特异性抗体（bispecific antibody，BsAb）是一类具有双亲嗜性的组合抗体，可同时与肿瘤细胞表面的肿瘤相关抗原和效应细胞表面的触发分子结合，有目的地将效应细胞导向肿瘤细胞，产生肿瘤细胞-效应细胞相互作用的理想结构，能克服 MHC 限制性，并使细胞免疫反应与体液免疫反应结合起来，直接触发效应细胞对靶细胞的有效溶解杀伤及介导 ADCC，从而增强抗体的效应功能。合理设计的 BsAb 介导的细胞毒性不会被内源性血清 IgG 所阻断。

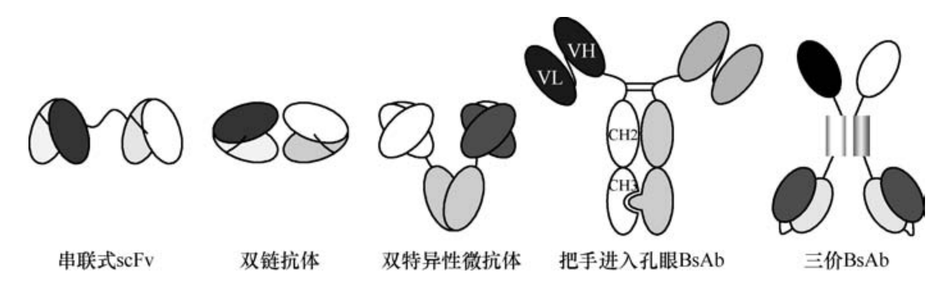


图 2　BsAb 的构建模式

早期研究主要通过杂交-杂交瘤及化学偶联技术制备 BsAb，遗憾的是，由于缺乏解决 BsAb 异二聚化的有效手段，难以形成设计所需的异二聚体，导致纯化困难、制备成本过高、产量低，不能满足规模化生产及临床试验的需要。随着基因工程抗体的发展，新型 BsAb 的设计、研发进入了一个新高潮，产生出各种模式的 BsAb，包括双链抗体（diabody）、串联式双链抗体（tandem diabody）、双特异性微抗体（bispecific minibody）等。然而，早期开发的 BsAb 在临床试验中的低效及毒副作用使轰轰烈烈的 BsAb 研究一度陷入低谷。

令人振奋的是，TriomAb 出人意料的成功为 BsAb 研究领域注入了新的活力。TriomAb 的构建源于 1995 年 Lindhofer 等对经典四体瘤技术的改进思路，利用种属限制性抗体重/轻链配对的特性，制备了含小鼠 IgG2a（靶向肿瘤相关抗原 EpCAM）和大鼠 IgG2b（靶向 CD3）的杂合分子（图 3）。这种新型的 BsAb（Catumaxomab）在极低浓度下（10pmol/L）即可有效地杀伤肿瘤细胞。有趣的是，TriomAb 仅与活化性受体 FcγRⅠ和 FcγRⅢ相互作用，而不与抑制性受体 FcγRⅡB 结合，不仅可激活 T 细胞，亦可诱导 NK 依赖的 ADCC 及刺激巨噬细胞

的吞噬功能。在 258 例卵巢癌患者的Ⅱ/Ⅲ期临床试验中，腹腔注射 Catumaxomab 治疗恶性腹水取得了明显的疗效。与普通抗体（如 Trastuzumab，每次剂量约 400mg）相比，Catumaxomab 的用量（约 100μg）低，仅为 1/4000。2009 年 4 月，欧盟批准 Catumaxomab 上市。虽然 Catumaxomab 可诱发体内抗小鼠及大鼠异源性蛋白的免疫反应，但由于用量低，并未影响其治疗效果。基于 TriomAb 技术改造的抗 Her-2 抗体（Ertumaxomab）及抗 CD20 抗体（Lymphomun™）亦显示出独特的优越性，可杀伤低表达 Her-2 和 CD20 的肿瘤细胞，而 Trastuzumab 即使对于高表达 Her-2 的肿瘤细胞也不能完全有效地发挥作用，这可能与 TriomAb 广泛激活效应细胞的机制有关。

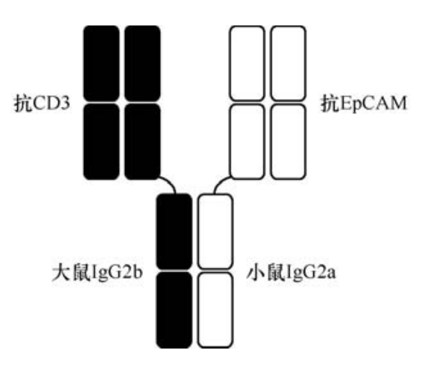


图 3　TriomAb 模式图

另一类令人激动的是基于 tandem diabody 结构的触发 T 细胞活化的基因工程化重组 BsAb，又称双特异性 T 细胞偶联分子（bispecific T cell engager，BiTE）。BiTE 的构建策略是通过一条含 5 个氨基酸残基的短肽将两个不同特异性的单链抗体相连，产生分子质量约 60 kDa 的蛋白质。BiTE 最大的特点是能在低浓度下有效杀伤肿瘤细胞，且不依赖 T 细胞活化的共刺激信号。体外实验结果显示，BiTE 浓度在 0.2～2pmol/L、效靶细胞比在 1∶10 的范围内，肿瘤细胞可被有效杀伤。更值得称道的是，尽管 BiTE 具有极高的溶杀效能，但在无肿瘤细胞存在时，即使 BiTE 浓度超过 EC_{50} 值几千倍，T 细胞仍不被激活，表明 BiTE 的杀伤活性具有严格的肿瘤细胞依赖性。目前，已有几个 BiTE 的研究推进到临床研究阶段，其中包括抗 CD3×抗 CD19 [Blinatumomab（MT103）]、抗 EpCAM×抗 CD3（MT110）。在复发性非霍奇金 B 淋巴瘤Ⅰ期临床试验中，给予剂量低至每平方米 5 μg 的 MT103，即可清除血中的肿瘤细胞。在急性 B 淋巴母细胞性白血病骨髓微小转移患者的Ⅱ期临床试验中，81% 的患者微小转移灶消失。这类患者的临床治疗手段非常有限，60% 的患者通常在 2 年内死亡，BiTE 的问世无疑具有极为重要的意义。MT110 是第二个进入临床试验的 BiTE，用于肺、结肠癌患者的治疗。此外，尚有 MT111（抗 CEA×抗 CD3）、抗 CD33×抗 CD3 BiTE 有待于临床试验。现已上市的治疗性抗体包括 Trastuzumab 、Panitumumab、Cetuximab 及 Omalizumab 亦将被改造成为 BiTE，这些新一代的抗体将迅速进入临床前研究。

3. 免疫细胞因子

利用抗体的靶向性传递免疫调节因子是抗体功能增效的另一条途径（表 1）。多种细胞因子如白介素（IL）2、IL-12、γ-干扰素、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因

子、α-肿瘤坏死因子等均曾被用于构建免疫细胞因子（immunocytokine），但现能检索到的已进入临床试验的免疫细胞因子均为抗体-IL-2融合蛋白。对此类融合蛋白的生物学活性评价资料证实，融合于免疫球蛋白重链羧端的IL-2的生物学活性与商品化的IL-2无异，而抗体部分亦可完好地保持亲本抗体的特异性结合活性，能有效地介导ADCC和CDC。临床前研究结果显示，肿瘤相关抗原特异性的抗体能把细胞因子有效地传递到肿瘤部位，免疫细胞因子的抗肿瘤活性比浓度高于其100倍的亲本抗体更有效。采用基因工程化的抗体甚至人源化抗体融合人源性毒性蛋白，不仅赋予这种双功能蛋白以巨大的治疗潜力，而且可大大降低其免疫原性，同时亦可避免大剂量细胞因子全身用药产生的毒副作用。目前，尚无免疫细胞因子上市。然而，治疗性抗体更新换代的强烈需求必将推动免疫细胞因子的开发进程。

表1　目前进入临床试验的免疫细胞因子

名称	靶标	治疗疾病	进展
Hu14.18-IL2	GD2	黑色素瘤、成神经细胞瘤	Ⅰ/Ⅱ临床
HuKS-IL2	EpCAM	卵巢癌、前列腺癌、结肠癌、黑色素瘤	Ⅰ期临床
L19-IL2	纤连蛋白额外区域B（EDB）	实体瘤如胰腺癌等	Ⅱ临床
抗-CD20-IL2	CD20	淋巴瘤	Ⅰ期临床

4. 抗体-放射性核素/化疗药物/毒素偶联物

应用抗体的特异性靶向功能及靶点拮抗作用，标记放射性核素、化学药物或毒素，可以大大提高疗效，降低抗体用量。将各种毒素、放射性核素、化疗药物与识别肿瘤特异抗原或肿瘤相关抗原的抗体偶联后，药效分子能集中作用于肿瘤细胞，既增强疗效又减少对机体的毒副作用。放射性核素与抗体的偶联物在体内能将前者运至药靶部位，并通过近距离电离辐射杀伤靶细胞，还可通过放射显像进行体内定位诊断。抗体与化疗药物分子的偶联方法一般采用化学法。这些偶联物对结肠癌、肝癌和胃癌等多种肿瘤均有一定的抗癌效应。抗体与生物毒素交联制备的偶联物或重组融合表达后的融合蛋白称为免疫毒素。免疫毒素基于抗体部分对相应抗原的特异识别作用及毒素部分具有的细胞毒作用，对肿瘤细胞具有杀伤效应，是很有潜力的免疫治疗方法。至今，美国FDA已批准5种放射性核素标记抗体，1种化学药物标记抗体上市。放射性核素标志物使用的核素发展趋势为：①具有较强杀伤力的高能β射线^{131}I、^{90}Y；②低能β射线和俄歇电子，如^{111}In，这类放射性核素具有较好的单细胞电离效应，可兼并用作诊断和治疗；③仅作诊断用途的^{99m}Tc。标记方法逐渐趋于温和、长效的标记方法，稳定性可达72小时以上。但是由于存在放射性，目前这类药物仍存在放射防护、应用不便、成本高昂等不足之处。化学药物标志物为多柔比星、卡奇霉素类药物。免疫

毒素多为细菌毒素，如 PE38、白喉毒素、蓖麻毒素等，多采用重组融合表达方式。在临床试验中，针对血液系统恶性肿瘤的免疫毒素数量最多。免疫毒素应用的最大障碍是其免疫原性，在血液系统肿瘤（尤其是在 T 细胞来源的肿瘤）治疗中，单次应用后免疫反应的发生率可达 40% 。体内产生的中和抗体则大大降低了免疫毒素的生物学活性。免疫毒素研发中的问题除免疫原性外，其对正常组织的毒性及制备中的问题均有待解决。

增强抗体效应功能的研究历经挫折，终于迈出了坚实而可喜的一步。随着对抗体认识的不断加深、基因工程新技术的不断发展、研究者思想的进一步解放及不懈的努力，具有更强功能的新型抗体从实验室走向临床的步伐必将大大加快。

参 考 文 献

Akito N , Rinpei N , Mitsuo S. 2009. Improving effector functions of antibodies for cancer treatment : enhancing ADCC and CDC. Drug Des Devel Ther ,3 :7～16

Asano R , Sone Y , Ikoma K , et al. 2008. Preferential heterodimerization of a bispecific diabody based on a humanized anti-EGFR antibody 528. Protein Eng Des Sel ,21 : 597～603

Chames P , Baty D. 2009. Bispecific antibodies for cancer therapy. mAbs ,1 : 6 , 1～9

Hudson PJ , Souriau C. 2003. Engineered antibodies. Nat Med ,9 : 129～134

King DM , Albertini MR , Schalch H , et al. 2004. Phase I clinical trial of the immunocytokine EMD 273063 in melanoma patients. J Clin Oncol ,22 (22) : 4463～4473

Kreitman R. 2009. Recombinant immunotoxins containing truncated bacterial toxins for the treatment of hematologic malignancies. BioDrugs ,23 (1) : 1～13

Osenga KL , Hank JA , Albertini MR , et al. 2006. A phase i clinical trial of the hu14. 18-il2 (emd 273063) as a treatment for children with refractory or recurrent neuroblastoma and melanoma : a study of the children's oncology group. Clin Cancer Res ,12 (6) : 1750～1759

Rossi EA , Goldenberg DM , Cardillo T , et al. 2008. Novel designs of multivalent anti-CD20 humanized antibodies as improved lymphoma therapeutics. Cancer Res ,68 : 8384～8392

Xie ZG , Guo N , Yu M , et al. 2004. A new format of bispecific antibody : highly efficient heterodimerization , expression and tumor cell lysis. J Immunol Methods ,296 : 95～101

Xie ZG , Shi M , Feng JN ,et al. 2003. A trivalent anti-erbB2/anti-CD16 bispecific antibody retargeting NK cells against human breast cancer cells. Biochem Biophys Res Commun ,311 : 307～312

撰稿人：陈志南[1] 廖成功[1] 郭 宁[2]

1 第四军医大学

2 军事医学科学院基础医学研究所

疫苗有效抗原成分的选择

Selection of Protective Antigens for Vaccine Development

自 1796 年第一剂用于预防天花的牛痘疫苗问世以来，疫苗作为抵御传染病的有效工具发挥了不可替代的作用，不但彻底消灭了天花，也使脊髓灰质炎等严重危害人类健康的疾病得到了根本控制。但在另一方面，大多数疫苗的研发并不顺利，进行疫苗有效成分的选择是研发疫苗成功的必要前提。

为达到良好的免疫保护效果，人们对疫苗有效成分的筛选经历了漫长的探索过程，取得了许多宝贵的经验。首先是针对相对单纯致病机制（如通过毒素）的病原体疫苗获得突破，如以白喉类毒素和破伤风类毒素等作为有效的疫苗成分研发了效果优良的疫苗；此后通过利用死疫苗或减毒疫苗（如麻疹疫苗、脊髓灰质炎疫苗、鼠疫疫苗和卡介苗等）使多种传染病得到了有效控制。

随着技术的进步和对疫苗免疫保护作用的深入认识，在提高疫苗保护率的同时，也更关注疫苗的安全性问题，疫苗的形式也从灭活疫苗和减毒活疫苗发展到组分疫苗、基因工程疫苗、亚单位疫苗或 DNA 疫苗等，预防性疫苗取得了长足进展。与此同时，许多致病因素比较复杂的病原体疫苗的进展却难获突破，按传统的认识，一般认为减毒活疫苗可能会优于死疫苗，模拟病原体自然感染途径的疫苗策略往往能取得更好的保护效果。为此，各国在疫苗发展中尝试了很多基因工程方法，但结果往往不尽如人意：要么为保留足够的免疫保护作用而过度保留了毒力，要么在充分减毒时保护率显著性降低；要么只能覆盖少量的菌型，要么为获得高覆盖度而构建的多价苗过于复杂而难以制备。究其原因，主要在于疫苗有效成分的高效筛选问题没有解决。

疫苗有效成分的筛选是一个复杂工程，需要借鉴一切相关的知识积累，并通过 IT 技术、生物信息学技术、转基因技术、免疫蛋白质组技术和表位分析技术等跨学科分析与筛选技术的有机整合，实现对免疫原中潜在保护性抗原的有效识别。

近年来蛋白质组技术的飞速发展，特别是免疫蛋白质组领域的研究进展为疫苗有效成分的筛选提供了新的可能。人们可以不必预先设定有限的目标进行筛选，而是一次性将可能参与刺激机体免疫应答的所有病原体成分高通量筛选出来，使疫苗有效成分选择的针对性更强和更全面。随着 IT 技术和生物信息技术

的进步，疫苗有效成分高效选择的前期工作不再出自传统的分子生物学实验室，而是通过大型计算机辅助的抗原结构和表位预测来完成，通过对当今科学技术成果的全球共享，使蛋白质晶体结构信息、表位结构信息、免疫识别与应答理论和计算模型的构建与驯化有机结合，并将成为今后疫苗有效抗原成分选择的重要对策。

疫苗有效抗原成分选择的另一重要对策将体现在反向遗传学（reverse genetics）技术的应用方面，它突破了以往从生物的性状、表型到遗传物质来研究保护性抗原的思路，利用了当今生物体基因组全序列基础，通过对靶基因进行必要的加工和修饰，以及这些修饰可能对生物体的表型、性状有何种影响等方面进行疫苗有效成分筛选。但由于其具有筛选工程量巨大和偶然性强等问题，仍需在现今技术基础上发展病原体保护性抗原的高效选择的针对性技术。

针对目前用于疫苗评价的动物模型还相当匮乏，大大落后于与疫苗发展相关的其他领域的进展要筛选到理想的疫苗有效成分的现状，加强对动物模型的研究工作，构建有效的保护性抗原评价用动物模型也必然会成为今后疫苗有效抗原成分选择的重要对策之一。对大量候选成分的比较、验证步骤是必不可少的。在以往动物模型的基础上，根据具体需要发展基因敲除动物和转基因动物将发挥越来越重要的作用。这类动物模型，不但使人们对相关免疫机制的了解更深入，也使动物模型在人类疫苗发展中的代表性越来越好。

疫苗有效抗原成分选择是一个世界性难题，此难题的解决，将使高效疫苗发展成为可能，并可利用有限的资源，提高成功率，使我国的疫苗发展在国际上占有更重要的地位。

参考文献

Enserink M. 2008. Meningitis. Less vaccine can be more. Science, 322 (5907): 1449

Ingrid W. 2006. Mouse studies question importance of Toll-like receptors to vaccines. Science, 314: 1859～1860

Laura MZ, Barbara RJ, Elizabeth C, et al. 2007. Barrel of monkey genes. Science, 316: 215

Maione D, Margarit I, Rinaudo CD, et al. 2005. Identification of a universal group B streptococcus vaccine by multiple genome screen. Science, 309 (5731): 148～150

McNamara LA, He Y, Yang Z. 2010. Using epitope predictions to evaluate efficacy and population coverage of the Mtb72f vaccine for tuberculosis. BMC Immunol, 11: 18

Mendum TA, Newcombe J, McNeilly CL, et al. 2009. Towards the immunoproteome of Neisseria meningitidis. PLoS One, 4 (6): e5940

Neumann G, Fujii K, Kino Y, et al. 2005. An improved reverse genetics system for influenza A virus generation and its implications for vaccine production. Proc Natl Acad Sci USA, 102(46): 16825～16829

Sette A. 2000. Tools of the trade in vaccine design. Science, 290 (5499): 2074b～2075b

Sette A, Peters B. 2007. Immune epitope mapping in the post-genomic era: lessons for vaccine development. Curr Opin Immunol, 19 (1): 106～110

撰稿人：张建中

中国疾病预防控制中心传染病预防控制所

疫苗研发中如何让病毒找到“新家”

How to Help Virus Settle in a New Home

病毒找“新家”，顾名思义，就是病毒从一种宿主到另一种宿主转移定居的进化演变过程。这种演变过程有两方面意义：一方面是病毒在自然遗传进化过程中使自己的宿主范围不断扩大，以适应自身生存的要求；另一方面的意义是人们为了预防某种病毒而人为扩展一些病毒的宿主范围，使病毒适应体外培养和扩增的需求，进而制备出相应的疫苗。第一种改变能使病毒的自然宿主发生改变，从而使一些本身并不感染人类的病毒转而使人感染患病，这将带给我们更多的疾病和灾难。而第二种改变可以使我们在预防病毒的手段方面掌握先机，特别在一些急发和新发传染病的应急防治中有着重要的作用。本文主要讨论研究病毒“乔迁”机制在传染病预防和控制工作中的意义。

病毒是最重要的传染病病原体，接种疫苗是防控病毒性传染病最有效的手段之一。除了基因工程疫苗，通过体外培养病毒或减毒株的方法仍然是病毒性疫苗制造中快捷有效的途径。病毒或其减毒株通过体外培养扩增后的全病毒体（原病毒株需要灭活处理）或其裂解组分就是疫苗的有效成分了。但并不是所有的病毒都可以适应体外培养，也就是说，有些病毒至今仍无法通过体外培养获得。在病毒体外培养中不同来源的细胞是病毒生长繁殖的主要基质，因此要使从不同生物体中分离出的病毒能够适应体外培养过程，首先要使病毒完成从原本的宿主细胞（“老家”）到另一种宿主细胞（“新家”）之间的“乔迁”过程。这种“乔迁”无论是采用自然的主动方式还是被动的人为方式，其相关机制的研究并不完善(图 1)。

目前，大部分有关病毒“乔迁”的研究都集中于细胞表面的相关病毒受体上。认为细胞膜上的相关受体和黏附蛋白是决定病毒能否感染细胞的关键因素。但更多的证据表明，仅仅有功能的病毒受体并不足以使病毒感染靶细胞，其入侵方式和细胞之间的作用也很重要。如艾滋病毒进入靶细胞时就需要多种细胞因子和受体蛋白的共同作用。我们目前研究病毒对宿主的适应机制还只能停留在表观遗传学或分子遗传水平上的突变过程。其实病毒适应一种细胞培养的过程要比我们想像的复杂得多，还有许多更深刻的机制尚不为人们所知，比如一些学者提出这种过程可能还与病毒和细胞基因之间的调控密切相关，病毒对细胞的这种适应能力是病毒和细胞之间长期作用和不断演变的动态过程。

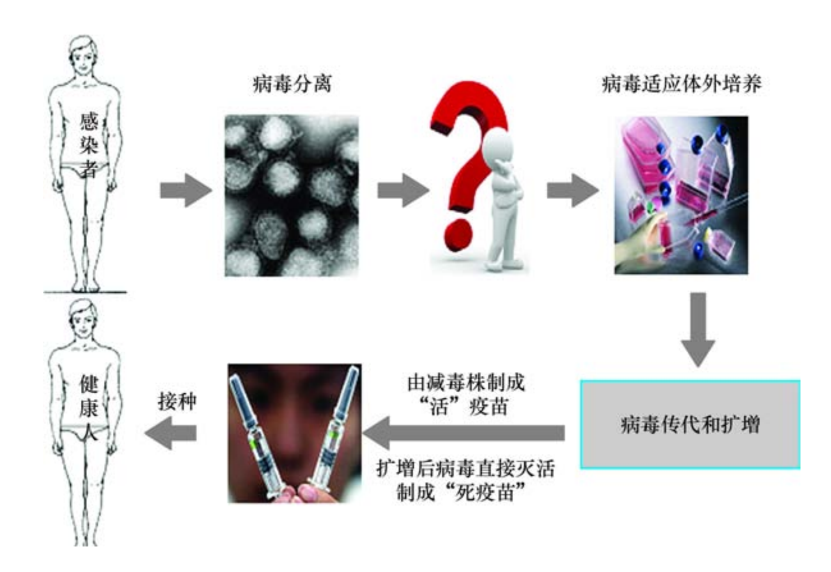


图 1　病毒适应体外扩增和培养的模式

尽管病毒对不同细胞的适应机制还没有阐明，但日臻完善的病毒学基础理论及研究手段为人为改变病毒的细胞嗜性提供了可能。众所周知，丙型肝炎病毒不能通过体外培养分离获得，这也使丙型肝炎病毒疫苗的研究开发遇到了障碍。近年，由日本学者从急性重症肝炎患者体内分离获得一株丙型肝炎病毒株——JFH1就可以适应在肝癌细胞系 Huh-7 细胞上的扩增培养。继而通过病毒复制相关基因与该丙型肝炎病毒株基因组之间的嵌合，大幅提升了体外培养过程中的病毒繁殖力。尽管这种分子遗传学操作在病毒体外适应性培养方面取得了一定进展，但其具体的机制至今仍不完全清楚。

总起来讲，病毒在细胞培养适应性方面的研究远远落后于病毒的进化速度，这也成为疾病控制和疫苗发展的最大障碍，因此阐明病毒适应细胞培养机制就成了摆在病毒疫苗学研究者面前最大的难题。其难点就在于目前使用的病毒表观遗传学研究方法并不能很客观准确地揭示病毒“乔迁”的规律和机制。

综观疫苗的研发历史和现状，无论是以灭活病原体为有效组分的“死疫苗”还是以减毒活病毒为主要组分的“活疫苗”，包括近年来发展的各类病毒组分疫苗，在研制过程中都必须经历病毒分离、抗原制备、免疫保护评价等一系列制造和验证过程。如果我们可以通过某种机制使任何病毒的体外培养不再困难，就不会对出现的任何一种新型病毒显得那么恐惧，而且对它的控制可以做到心中有数。以 2009 年曾经暴发流行的甲型流感为例，此次流感暴发是由于猪流感病毒与禽流感病毒在动物宿主中的重配后形成的一种新的甲型流感病毒在人之间的传播所引起，是一种典型的由于病毒重配后宿主发生改变的实例。而研究机构根据

流感病毒的特性很快在鸡胚中成功进行了病毒的分离和扩增，依据以往流感疫苗的研制经验最终确定了疫苗的生产工艺，但病毒在体外培养的宿主还是以鸡胚细胞为主，而鸡胚生产的受限因素较多，并且鸡也是流感病毒的自然宿主，这在很大程度上限制了疫苗的产量，同时也留下了一定的安全风险。可以试想，如果我们已经掌握了这种病毒在宿主间“乔迁”的规律，就可以有目的地使病毒在某种针对疫苗生产更加安全可靠的传代细胞系上得到繁殖和扩增，这既解决了疫苗产能限制的问题，也避免了由生产过程带来的疫苗安全问题。

如上所述，由于对病毒细胞培养适应机制研究的滞后，病毒性疫苗研发缺少了一个有力工具，如果我们能阐明病毒适应细胞培养的机制，并掌握了其中规律，为我所用，许多与此相关的病毒防治难题也就迎刃而解了。

参考文献

Kato T , Date T , Miyamoto , et al. 2003. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. Gastroenterology ,125(6):1808～1817

Kaul A , Woerz I , Meuleman P , et al. 2007. Cell culture adaptation of hepatitis C virus and in vivo viability of an adapted variant. J Virol ,81 :13168～13179

Koutsoudakis G , Herrmann E , Kallis S , et al. 2007. The level of CD81 cell surface expression is a key determinant for productive entry of hepatitis C virus into host cells. J Virol ,81(2): 588～598

Lindenbach B D , Evans M J , Syder A J , et al. 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. Science ,309(5734): 623～626

Lohmann V , Korner F , Koch J , et al. 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. Science ,285(5424):110～113

Yi M , Ma Y , Yates J , et al. 2007. Compensatory mutations in E1 , p7 ,NS2 , and NS3 enhance yields of cell culture-infectious intergenotypic chimeric hepatitis C virus. J Virol ,81 :629～638

撰稿人:李启明
北京生物制品研究所

如何设计慢性感染病疫苗

How to Design the Chronic Infectious Diseases Vaccine

许多引起慢性持续性感染的病原体在长期的进化过程中获得了主动或被动逃避机体免疫系统的能力，自然感染的结局往往是慢性持续性感染，并不能激发有效的保护性免疫。此类病原体（包括多种细菌、病毒或寄生虫类病原微生物）所引发的感染已成为当前感染性疾病的一个重要类型，并与心脑血管病和多种重要肿瘤的发生密切相关，HBV 病毒感染有效的预防性疫苗使用已数十年，针对人乳头状瘤病毒（human papilloma virus，HPV）的预防性疫苗也已获得成功；但对于乙型肝炎病毒（hepatitis B virus，HBV）、幽门螺杆菌（*Helicobacter pylori*，*Hp*）、人类免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus，HIV）、结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*）、血吸虫和 HPV 等慢性感染的有效治疗性疫苗研发却十分困难。由于目前尚存在大量的现症慢性感染人群，全球 *Hp* 慢性感染者约占全球人口的一半，慢性感染是胃癌、肝癌、宫颈癌和鼻咽癌等多种肿瘤发生的重要病因之一。如何针对慢性感染的特征，设计能够阻断慢性感染自然进程的疫苗，已成为一个国际性的难题。

针对慢性感染的疫苗不尽如人意，究其原因主要是目前科学进展尚未能对慢性感染的形成机制和阻断慢性感染的关键环节有足够的认识；以病原体 HIV 为代表的慢性感染者，由于机体的免疫系统遭到了直接的感染攻击，处于免疫缺陷状态，使用何种疫苗成分和免疫策略重新唤醒机体的免疫功能是一个尚未解决的难题。以 HBV 感染为代表的慢性感染方式则通过其遗传物质整合入宿主染色体而不易被免疫系统清除。而以 *Hp* 为代表的慢性感染，则主要因为病原体的黏附定居因子（黏附素）采用了对人类自身的受体配体系统的模拟策略，使机体免疫系统无法对其识别并产生针对黏附靶点的免疫反应，宿主很难产生有效的抗黏附效果，而一旦产生抗黏附定居抗体，也往往会诱导自身免疫损伤。虽然不同的慢性感染各有其特点，但其产生慢性感染的生物学机制往往恰好与研发有效疫苗的思路相重叠，使相关疫苗的研发陷于困境。

慢性感染是病原体与宿主间长期共进化的一种表现形式，研制针对慢性感染的疫苗十分复杂，不太容易通过简单的剂型调整、抗原组合方案选择和佐剂使用等获得突破，由于不同病原体引起的慢性感染的机制差异明显，其疫苗的设计无法沿用预防性疫苗的设计策略。

慢性感染病疫苗设计策略主要应根据造成慢性感染的病原体的具体情况入手，寻找到确切的免疫抑制、免疫耐受或免疫逃避机制和关键作用靶点，将病原体与宿主的相互作用作为一个整体来考虑。其中，对艾滋病疫苗的研制应该是一个特例，虽然近期在疫苗研究中观察到了一定的人群保护效果，但疫苗获得根本突破的路还很远。对于那些由于分子模拟而引发的慢性感染病，其疫苗设计中应注意要在产生免疫治疗效果的同时，避免自身免疫和交叉免疫损伤的发生。为此，慢性感染病疫苗设计中对病原体天然结构的改造将会是必需的，其主要目的是使其在获得免疫原性的同时，避免与原结合表位的抗原交叉，但需要使起诱导产生的抗体产生必要的空间位阻效应。对于乙型肝炎类慢性感染者，治疗性疫苗的研发则必须充分考虑病原体基因组在人类染色体中的整合和病毒复制等多方面的因素，已尝试采用抗原抗体复合物疫苗、蛋白质疫苗、核酸（deoxyribonucleic acid，DNA）疫苗及多肽疫苗等多种设计策略，并提出了将抗体诱导剂、免疫调节剂和病毒抑制剂联用的“免疫三联疗法”，期望有所突破。

慢性感染病疫苗设计的真正难点主要体现在缺乏相关免疫学认识的指导，我们对慢性感染病的认识还不够深入，如不加强慢性感染病发病机制等方面的基础研究和相关免疫学问题的深入研究，慢性感染病疫苗的设计将很难有所突破。慢性感染病的致病机制各有特点，应逐一深入研究。不同的疾病应有不同的对策，不可能“标准化”。此为研制慢性感染病疫苗的困难之一。

慢性感染病疫苗的设计问题已经构成了一个不能回避的重要科学难题，需要病毒学、细菌学、寄生虫学、免疫学、生物工程学和细胞生物学等多学科研究者的共同努力。对于以持续黏附定居为特征的细菌类感染和某些病毒感染，通过诱导有效的中和抗体产生或改变抗感染免疫相关的细胞免疫类型，可能成为设计的重点；将 DNA 疫苗和病毒载体疫苗分别在初次免疫和加强免疫中合理组合，有望在打破长期慢性感染状态中发挥作用。而慢病毒载体由于其具有感染非分裂期细胞及容纳外源性目的基因片段大等优点，在将来设计慢性感染病疫苗时也会成为一个有用的工具。有理由相信，在不远的将来通过此问题的解决，使许多重要疫苗（如 HIV 疫苗、与肿瘤发生相关的细菌和病毒疫苗，以及许多带虫免疫的寄生虫疫苗等）的发展获得突破。

参考文献

Cassell GH. 1998. Infectious causes of chronic inflammatory diseases and cancer. Emerg Infect Dis, 4 (3): 475～487

Cohen J. 2009. AIDS vaccine research. HIV natural resistance field finally overcomes resistance. Science, 326 (5959): 1476～1477

Danesh J, Collins R, Peto R. 1997. Chronic infections and coronary heart disease: is there a link?

Lancet, 350: 430～436
Lages CS, Suffia I, Velilla PA, et al. 2008. Functional regulatory T cells accumulate in aged hosts and promote chronic infectious disease reactivation. J Immunol, 181 (3): 1835～1848
Lok AS, McMahon BJ. 2001. Chronic hepatitis B. Hepatology, 34: 1225～1241
Morris JDH, Eddleston ALWF, Crook T. 1995. Viral infection and cancer. Lancet, 346: 754～758
Parkin DM. 2006. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. Int J Cancer, 118 (12): 3030～3304

撰稿人:张建中
中国疾病预防控制中心传染病预防控制所

疫苗安全保障的第一关

The First Step to Ensure the Vaccine Safety

接种疫苗是控制传染性疾病最行之有效的措施，是保护人民群众健康的最重要工具。但是，迄今为止的使用经验表明，没有一种疫苗是绝对安全的，总是存在着大大小小的、有时是罕见的但却是非常严重的安全性问题。由于大部分疫苗的使用对象是健康人群，特别是健康儿童，因此疫苗的安全问题格外引人关注。

疫苗安全与相应的各个环节密切相关，包括研究（临床前和临床研究）、生产、检验、保存、运输、使用、监测等（图 1）。国家也相应出台了一系列法律法规以最大可能地保障疫苗的安全。疫苗安全既涉及复杂的监管问题，也存在复杂的科学问题，其中最重要的第一道防线就是疫苗研制过程中的临床前安全性评价，即通常采用动物模型进行的体内安全性研究，用于推测疫苗在人体使用时的安全性。但是限于目前研究技术水平、可获得动物模型及人与动物种属差异的限制，临床前动物安全性研究还不能百分之百预测人体的安全性，尤其是对于新疫苗的评价。

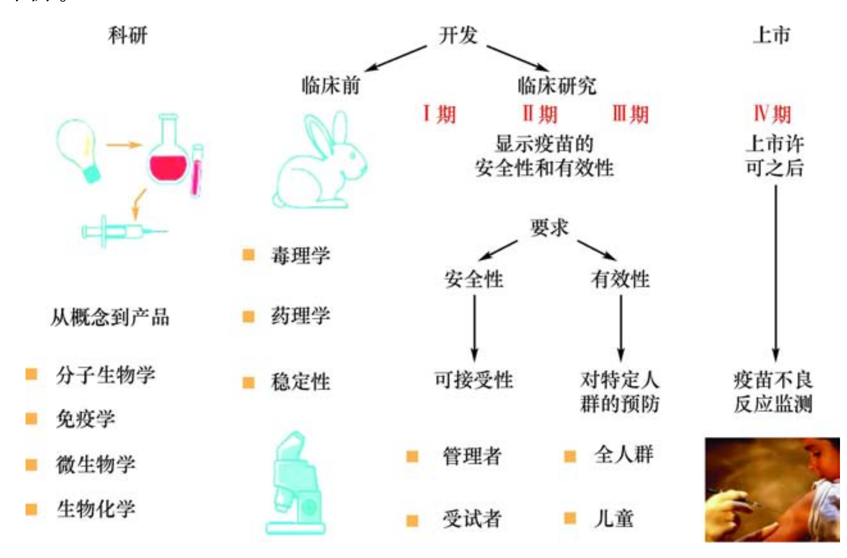


图 1　疫苗的研发与应用模式图

个体免疫系统对疫苗反应的差异可导致免疫接种后出现不良反应，疫苗安全

的一个含义是指其风险在人体可以承受的范围内，比如接种疫苗后常见的短暂的不良反应（疼痛、发热等）。疫苗是通过激发机体免疫系统达到预防疾病的目的，机体在接种疫苗时，疫苗对抗原处理、提呈、细胞因子合成与释放、细胞增殖与分化和抗体分泌等任何过程的影响，都会引起机体免疫反应的变化，影响机体对外来抗原的正常免疫防御过程，进而产生免疫毒性。疫苗导致的免疫毒性包括免疫抑制、免疫原性相关毒性、超敏反应、自身免疫和不良免疫刺激等。例如，疫苗免疫活性的放大可能导致疫苗的不良反应。新型疫苗所具有的其他安全性隐患还包括：重组蛋白类疫苗的过敏反应、免疫原性可能导致的中和自身活性或引起自身免疫疾病；重组病毒和细菌载体疫苗的复制型病毒感染、与野生型重组及与靶细胞基因组的整合；DNA疫苗的外源抗原在体内长期表达引起的过度免疫或免疫耐受，DNA分子本身的结构可能与其他细胞内外分子相互作用导致分子和细胞水平的毒性，由其诱生的细胞因子，有可能增加机体对毒性物质的敏感性或引起过度免疫激活。因此，疫苗用于人体之前，应进行充分的免疫毒性预测研究。另外，疫苗免疫毒性问题的复杂性在于，疫苗种类繁多，每一种疫苗都有各自不同的作用特点，疫苗的免疫毒性更需要按照其对免疫系统影响的特点设计不同的检测终点进行评价。

免疫毒性的评价方法中比较成熟的是评价化学物质或化学药物的免疫抑制的方法，主要是基于Luster等的工作，即分为Tier Ⅰ和Tier Ⅱ试验。Tier Ⅰ（筛选）试验包括血液学、体重和脏器重量、淋巴器官细胞分型和组织学、体液免疫评价（使用IgM抗体形成细胞反应和B细胞增殖反应）、细胞免疫评价（有丝分裂原和同种异体抗原刺激的T细胞增殖反应）及NK细胞活性评价。当在Tier Ⅰ试验中观察到某种影响时，免疫缺陷的本质可以通过Tier Ⅱ试验来确认，包括免疫病理学（T、B细胞数量测定），体液免疫应答（HI）的IgG抗体反应测定，采用细胞毒性T细胞或DTH试验进行细胞免疫（CMI）功能评价等。但是上述方法主要用于检测较强的免疫抑制或免疫激活，而疫苗引起的免疫毒性大部分为弱的免疫毒性反应，需要特异性的敏感的检测方法，因此上述方法不适合直接用于疫苗的免疫毒性研究。目前，没有专门的关于疫苗的免疫毒性评价技术要求，权威机构也不推荐采用常规的化学药物的免疫毒性评价策略。而针对药物过敏、超敏反应、自身免疫等免疫毒性的评价，已经建立了评价超敏反应的豚鼠模型和小鼠局部淋巴结试验、评价自身免疫的腘窝淋巴结试验等，但由于自身免疫病的复杂性、其免疫毒性反应具有很强的个体差异性、发生频率低，因此不论针对化学药物或疫苗，上述方法均不能体现很好的预测作用，国际上尚缺少有效的模型和技术方法进行评价。

目前新疫苗的研究热点在于寻找新的作用机制以期提高免疫保护效果，而对疫苗本身的免疫毒性的评价判断则试图突破仅仅从疫苗构建机制上推测其人体使

用的安全性，从而在应用于人体前尽可能多地获得动物毒理学研究的数据支持，但是关于不断涌现的新型疫苗的免疫毒性问题，目前国际上尚缺少适当的动物模型、灵敏的检测方法和技术手段，尚未形成统一、完善的研究体系，同时没有国际统一的指导原则，各国内部也没有统一的技术标准。建立针对疫苗的全新的免疫毒性评价体系，即从免疫器官、免疫细胞、免疫分子、免疫功能等各个水平对机体免疫状态进行整体的评价是疫苗研发过程中的重要课题。目前研究的重点在于疫苗免疫后整体免疫功能的评价、细胞因子的变化等，期望通过不断涌现的新型技术，例如各种新的免疫分子、免疫功能检测技术、免疫毒理基因组学（immunotoxicogenomics）等技术解决这一难题。

参考文献

Baker DL, Finco-Kent DL, Reagan WJ, et al. 2008. Optimization and validation of a flow cytometric method for immunophenotyping peripheral blood lymphocytes from cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis). Vet Clin Pathol, 37 (1): 42～48

Descotes J. 2005. Immunotoxicology: role in the safety assessment of drugs. Drug Saf, 28 (2): 127～136

Gary R Burleson, Florence G Burleson. 2008. Testing human biologics in animal host resistance models. J Immunotoxicology, 5 (1): 23～31

Gore ER. 2006. Immune function tests for hazard identification: a paradigm shift in drug. development. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 98 (4): 331～335

Huo Y, Li B, Zhang Y, et al. 2007. Pre-clinical safety evaluation of heat shock protein 65-MUC1 peptide fusion protein. Regul Toxicol Pharmacol, 49 (1): 63～74

Luster MI, Johnson VJ, Yucesoy B, et al. 2005. Biomarkers to assess potential developmental immunotoxicity in children. Toxicol Appl Pharmacol, 206 (2): 229～236

Roth DR, Roman D, Ulrich P, et al. 2006. Design and evaluation of immunotoxicity studies. Exp Toxicol Pathol, 57 (5-6): 367～371

Weir AB. 2008. Hazard identification and risk assessment for biologics targeting the immune system. J Immunotoxicol, 5 (1): 3～10

撰稿人：曾　明　霍　艳

中国药品生物制品检定所

疫苗评价为何要用动物模型

Why Do We Establish Animal Models Used for Vaccine Evaluation

疫苗在未进行临床试验以前，应对其预期的特异性保护效果和毒性反应在动物中进行评价，这就需要动物的反应性与人体反应性一致。但是由于动物与人类基因的差异，不同病原体对动物和人体的敏感性不同，而且所诱发疾病的临床表现、免疫反应和特异性毒性反应也并不完全一致。

将动物基因组根据动物模型的要求对其基因进行人为的定向修改或改造，所产生的动物为专一性模型动物。这是目前为止研究基因-蛋白质-生命现象最为有效和生命集成度最高的综合研究体系之一。基因改造后的专一性模型动物能够对特定病原体的敏感性、免疫反应性及毒性反应性等与人体的反应性一致。近些年来已建立了部分病原体的感染动物模型及含人 MHC 分子的免疫评价动物模型，但这些模型的稳定性尚需评估，而且也需要建立针对多种病原体敏感的转基因动物，包括小鼠、豚鼠、兔、灵长目动物等，尤其是反应特异性毒性的动物模型。

动物模型在疫苗评价中起着关键性的作用，一方面是对疫苗的保护效果进行评价，另一方面是对疫苗的特异性不良反应指标如神经毒性、各种疫苗的特异性毒性等进行评价。若没有敏感的动物模型，疫苗的保护效果和安全性则无法在临床研究前进行全面的评价，在此情况下进入临床研究则会造成安全隐患及资源的浪费，明显阻制了疫苗的研发。因此，动物模型的建立及完善仍然是疫苗评价中的一个重点。

目前对动物的基因改造主要采用显微注射法、利用重组酶原理进行的基因敲入和基因敲除、病毒载体法、人工酵母染色体载体介导法及精子介导法等。比较成功的转基因动物模型是转入人受体的小鼠，替代猴子作为口服脊髓灰质炎病毒疫苗的神经毒性评价的动物模型。但由于对基因功能的了解尚不十分清楚，目前制备转基因动物模型用于疫苗的评价还存在许多困难，主要体现在以下方面：

（1）外源基因导入效率低：由于显微注射的技术问题，常常导致外源基因的导入成功率不高。即使外源基因成功导入，由于外源基因多是随机整合入宿主基因组中，整合的效率很难受人为控制，往往表现为整合效率比较低。另外，还有些因素造成受精卵不着床、流产等问题也是造成导入效率低的重要原因。

（2）致死、致畸的发生：由于外源基因在宿主基因组中整合位点不可控制，往往造成整合基因在胚胎发育过程中表达异常，从而造成个体的死亡；或者转入

的基因可能为随机插入或引起宿主细胞的基因突变，将可能导致内源基因的破坏和失活，也可能激活正常情况被关闭的基因，这些因素都可能导致转基因动物的死亡，也可能使子代个体出现畸形、发育不良，或者带有某些不可预知的病态。而且还可能出现更为复杂的情况，由于整合外源基因的动物容易死亡，往往存活下来的动物多为外源基因表达较弱或非期望的转基因动物模型。

(3) 目的基因表达效率不足或无期望的表型：由于种种原因，所得到的转基因动物的目的基因不表达或表达水平不高，失去了转基因的基本意义。转基因的表达不仅受位置效应、转基因本身结构、载体表达元件活性等的影响，在宿主体内还会因转基因甲基化及细胞因子的影响等因素而表达下降甚至关闭。另外，机体是由一个复杂的网络所组成，虽然按计划对动物的基因做了改造，但却不一定得到预期的表型；或者目的基因虽有表达，但表达的效率过低，致使转基因动物模型并不能很好地用于疫苗评价。

(4) 组织特异性表达外源基因的问题：要评价疫苗在特定组织中的相关毒性反应就需要特定基因在某些组织（如神经系统中）内有较高的表达，同时为了评价相关的免疫指标又需要在免疫组织中具有足够的外源基因表达。要使转基因动物与人对疫苗的反应性有更高的一致性，又需要应用更为广泛的启动子使转入的特定基因在宿主中有更广泛的表达，才能更好地表现疫苗及病毒在体内的生活周期，从而更好地用于评价疫苗的体内效果。

(5) 周期长：用于疫苗评价的转基因动物模型，常规操作工作量大、周期长，如产生一个基因敲除小鼠至少要 1 年左右的时间，同时作为疫苗评价的动物模型，因为需要观测多个指标，就需要对其不断改善。另外，病毒或者疫苗感染机体是个复杂的过程，要准确找出疫苗感染的相关受体，就需要对其感染机制有较深入的了解，因此建立相应的转基因动物模型需要一个长期的过程。

针对特定病原体对动物的基因改造受多方面因素的影响，尤其是受具有特定功能的基因是否明确、基因改造技术是否完善及动物基因改造后遗传基因是否稳定传代等因素的限制。

参 考 文 献

董大勇，徐俊杰，陈薇．2006. 炭疽疫苗及治疗药物筛选和评价模型研究进展．中国学术期刊，12(17)：5

孟胜利，徐葛林．2006 在非人灵长类动物模型中对 3 种 DNA 疫苗肌肉接种方法的比较评价．国际生物制品学杂志，(5)：238

谢莲萍．2009. 转基因动物技术及其研究进展．畜牧与饲料科学，30(9)：77～87

张扬清，鲍琳琳，孔琪，等．2004. SARS 病原体的检测及其在动物模型鉴定及疫苗评价中的应用．中国比较医学杂志，14(2)

Dragunsky E，Nomura T，Karpinski K，et al. 2003. Transgenic mice as an alternative to mon-

keys for neurovirulence testing of live oral poliovirus vaccine : validation by a WHO collaborative study. Bull World Health Organ, 81(4):251～260

Gupta UD, Katoch VM. 2009. Animal models of tuberculosis for vaccine development. Indian J Med Res,129(1): 11～18

Pascolo S. 2005. HLA class I transgenic mice: development, utilization and improvement. Expert Opin Biol Ther,5(7):919～938

Shane C,Laura H, Luis J,et al. 2002 Poliovirus pathogenesis in a new poliovirus receptor transgenic mouse model : age-dependent paralysis and a mucosal route of infection. Journal of General Virology,83: 1707～1720

Sønderstrup G, Cope AP, Patel S, et al. 1999. HLA class Ⅱ transgenic mice: models of the human $CD4^+$ T-cell immune response. Immunol Rev,172:335～343

撰稿人:王佑春　林　林

中国药品生物制品检定所

疫苗佐剂研发中的挑战

Challenges in Vaccine Adjuvant Research and Development

疫苗佐剂是指加入疫苗中能够增强疫苗抗原免疫原性的物质。早在 1925 年，Ramon 发现木薯粉加入白喉或破伤风类毒素中能够增强抗毒素的产生，佐剂（adjuvant）的概念也由此产生。Glenny 等于 1926 年发现了铝盐的佐剂效应，此后铝佐剂成为第一种也是迄今为止使用最广泛的人用疫苗佐剂。

传统疫苗主要由灭活和减毒的病原微生物制备而来，除了含有特异性抗原成分，还含有外毒素、内毒素、脂蛋白、多糖和核酸等多种“内在佐剂”成分，从而能够诱生较强的免疫应答。但随着蛋白表达和纯化技术的发展，疫苗的抗原成分越来越单一，纯度也越来越高，相应地免疫原性也大大降低了，必须加入合适的疫苗佐剂才能引起有效的免疫应答。随着 20 世纪 80 年代重组 DNA 技术开始在疫苗中应用，对疫苗佐剂的研究越来越引起人们的关注，而且事实上疫苗佐剂已成为制约基因工程疫苗发展的主要瓶颈。

疫苗佐剂根据作用机制和功能主要有以下三大类：

第一类是具有储存、缓释和靶向抗原作用的递送系统（delivery systems）。递送系统能够在注射局部储存和缓释抗原，通过持续刺激免疫系统从而引起强有效的免疫应答。递送系统往往具有纳米级尺度，因而可以有效地将抗原靶向到抗原提呈细胞（antigen presenting cell，APC），从而促进抗原的加工和提呈。递送系统往往能够在注射局部或引流淋巴结引起局部炎症反应，从而促进抗原特异性免疫应答。目前批准使用的大多数人用疫苗佐剂如铝佐剂及 MF59、AS03 和 AF03 等水包油乳剂均属于这一类型。

第二类是激活免疫受体的免疫刺激型佐剂。自 1996 年以来病原相关分子模式（pathogen-associated molecular pattern，PAMP）及其受体的发现大大促进了免疫刺激型佐剂的研究进展。近年来 PAMP 及其衍生物已广泛用于人用疫苗佐剂的研究，其中已批准使用的 AS04 的主要活性成分之一为细菌脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）的衍生物单磷酰脂质 A（monophosphoryl lipid A，MPL），另一个进展较快的为 TLR9（Toll-like receptor 9）的配体 CpG-ODN（CpG oligodeoxynucleotide），目前正在进行预防性乙肝疫苗的Ⅲ期临床研究。PAMP 作为疫苗佐剂的主要机制是向 APC 提供免疫应答的“信号 0”，从而上调 APC 的抗原提呈（“信号 1”）及 CD40、CD80 和 CD86 等共刺激分子（co-stimulatory mol-

ecules)的表达（信号2），并通过IL-12等细胞因子调控免疫应答的类型（信号3）。

第三类是同时兼具以上两种功能的复合佐剂。目前批准使用的人用疫苗佐剂AS04属于这一类型，其主要成分为氢氧化铝和MPL。随着研究的不断深入，越来越多的疫苗佐剂属于这一类型，如正在进行临床研究的AS01、AS02及氢氧化铝和CpG-ODN的复合佐剂等。

虽然疫苗佐剂具有80年以上的研究和使用历史，但能够大规模使用的安全有效的人用疫苗佐剂仍极其有限。除了铝佐剂，目前广泛用于人用疫苗的佐剂只有MF59、AS03和AF03等水包油乳剂及由氢氧化铝和MPL组成的AS04复合佐剂。近二十多年随着分子免疫学的迅速发展，抗原特异性免疫应答及佐剂非特异性免疫应答的机制已经相对清楚，人们可以根据“抗原＋佐剂＝疫苗”的原理来理性设计疫苗，而且可供研究的候选人用疫苗佐剂尤其是免疫刺激型佐剂的数量也越来越多，但是新型人用疫苗佐剂的研究和应用仍有以下两个难点：

1. 如何根据疾病保护性免疫应答的实际需要来设计和筛选疫苗佐剂

目前使用的绝大多数人用疫苗是在疾病免疫保护机制尚不清楚的情况下研制成功的“经验性”疫苗。对于传统疫苗技术解决不了的新型疫苗，疫苗理性设计就显得极为重要。疫苗理性设计包括疾病保护性免疫应答机制的研究、保护性抗原的研究及疫苗佐剂的研究等，其中疾病保护性免疫应答机制的阐明对疫苗抗原和疫苗佐剂的设计与筛选具有重要指导意义。现已明确，疫苗佐剂不但能够在量上增强免疫应答的强度，而且能够在质上改变免疫应答的类型。因此，疫苗理性设计的一个重要内容是如何根据疾病保护性免疫应答的实际需要（即免疫应答类型和免疫应答强度）来针对性地设计和筛选疫苗佐剂。

然而在具体实施过程中，目前科学家面临两方面的巨大挑战。一方面对于许多迫切需要疫苗的疾病，尤其是HIV、结核和疟疾等严重威胁人类健康的重大传染病，其保护性免疫应答机制仍不明确。人们并不清楚对抗这些疾病到底需要体液免疫还是细胞免疫、Th1类免疫还是Th2类免疫、$CD4^+$ T细胞免疫还是$CD8^+$ T细胞免疫、系统性免疫还是黏膜免疫等，因此也无法针对性地进行疫苗佐剂研究。另一方面，即使是对于保护性免疫应答机制相对清楚的疾病，人们也面临着如何通过使用疫苗佐剂去打破免疫耐受、如何通过使用疫苗佐剂促进蛋白质和多肽抗原的交叉提呈（cross-presentation）和交叉致敏（cross-priming）去诱生有效的$CD8^+$细胞毒性T细胞反应、如何通过黏膜佐剂去诱生有效的黏膜免疫等重要问题。

2. 如何对疫苗佐剂进行有效的安全性和有效性评价

疫苗佐剂主要是用于针对健康人群尤其是健康儿童的预防性疫苗，因此除了

有效性，其安全性要求极高。疫苗佐剂的整个研发过程就是一个从动物实验到人体临床再到上市后再评价不断进行安全性和有效性评价的过程。疫苗佐剂有两个特性严重制约了其安全性和有效性评价。一方面疫苗佐剂具有相对的抗原特异性，即一种疫苗佐剂并不是对所有抗原具有同样的安全性和有效性，换言之，不同的抗原/佐剂组合具有不同的安全性和有效性。与之相对应的矛盾是新型抗原尤其是基因工程抗原最需要疫苗佐剂，而出于安全性考虑，新疫苗佐剂的初次临床评价只能选用已上市疫苗。另一方面是占候选疫苗佐剂比例最大的免疫刺激型佐剂的受体和效应细胞具有种属特异性，从而使得临床前动物实验中得到的安全性和有效性数据难以反映人体临床的实际情况。因此，疫苗佐剂的安全性和有效性评价结果具有很大程度的不可预测性。

疫苗佐剂抗原特异性的原因主要在于抗原本身的理化性质及混杂在抗原中的其他成分如杂质和添加剂等。理论上，抗原成分越是简单明确、纯度越高、批间差越小，越容易进行安全性和有效性评价。这一点也同样适用于疫苗佐剂，也就是说要尽量使用成分简单明确、作用机制简单明确、便于生产质控的疫苗佐剂。克服免疫刺激型佐剂种属特异性的一个策略是在前期研究中用不同物种的免疫细胞进行体外对比试验，这十分有助于评估疫苗佐剂的有效性，但难以进行安全性评估。

疫苗佐剂安全性和有效性评价大致要遵循从现有疫苗到新疫苗、从治疗性疫苗到预防性疫苗、从成人疫苗到儿童疫苗的原则。临床前应在多种动物中分别评价佐剂的安全性及疫苗/佐剂组合的安全性和有效性。临床研究中应在Ⅰ期分别评价佐剂及疫苗/佐剂组合的安全性，在Ⅱ和Ⅲ期循序渐进地评价疫苗/佐剂组合的安全性和有效性。只有在人体临床中充分评价新疫苗佐剂对已上市疫苗的安全性之后，才能将该佐剂用于新疫苗抗原的临床研究。只有在上市后充分评价发生罕见不良反应的风险之后，才能逐渐将新佐剂疫苗用于儿童。因此，疫苗佐剂的研发过程往往需要15～20年甚至更长时间。

疫苗佐剂主要通过储存/缓释/靶向抗原和诱生炎症反应这两种机制起作用，其中后者也是引起疫苗不良反应的主要原因之一。因此，如何平衡安全性和有效性就成了一个疫苗佐剂能否最终使用的关键，这需要各国药监当局和生产厂家在得到大量临床数据后根据风险/效益比共同协商决定。

参考文献

Giudice GD，Podda A，Rappuoli R. 2002. What are the limits of adjuvanticity? Vaccine，20：S38～S41

Mbow ML，Gregorio ED，Valiante NM，et al. 2010. New adjuvants for human vaccines. Current Opinion in Immunology，22：411～416

Mckee AS, Macleod MK, Kappler JW. 2010. Immune mechanisms of protection: can adjuvants rise to the challenge? BMC Biology, 8: 37
Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA. 2008. Vaccines. Philadelphia: Saunders Elsevier
Schultze V, D' Agosto V, Wack A. 2008. Safety of MF59 adjuvant. Vaccine, 26: 3209～3222

撰稿人：杨春亭[1]　王　宾[2]　许洪林[1]
1 北京生物制品研究所
2 中国农业大学

如何提高肿瘤疫苗治疗效果

How to Improve the Therapeutic Effects of Tumor Vaccine

肿瘤疫苗不同于经典的预防性的传染病疫苗，它主要用于肿瘤的治疗和防止肿瘤的复发和转移。肿瘤治疗性疫苗的研究历史较久远，正规地进入商业化临床研究是从 20 世纪 80 年代开始，到 20 世纪 90 年代已积累了一些经验。此后肿瘤疫苗临床研究稳定发展。肿瘤疫苗主要有天然的细胞（修饰的树突状细胞或肿瘤细胞）疫苗、合成肽疫苗和基因疫苗等。在动物模型中，有些肿瘤疫苗已显示了良好的抗肿瘤治疗作用，甚至可使肿瘤完全消退，并可产生肿瘤特异性免疫记忆，能抵抗相同肿瘤的再次攻击。然而，肿瘤疫苗临床研究的结果并不令人满意，虽然能取得一些疗效，但与人们的期望值相距尚远。

哪些因素在干扰肿瘤疫苗的治疗效果呢？在肿瘤疫苗的研究中，抗原和佐剂的选择固然重要，然而，在实际应用中更多的问题是来自于荷瘤宿主的内部，涉及各种各样的肿瘤逃脱免疫监视和攻击的机制（图 1）。肿瘤疫苗诱导的主要效应细胞是 T 细胞。T 细胞是通过 T 细胞受体识别肿瘤细胞表达的主要组织相容性复合体（major histocompatibility complex，MHC）Ⅰ类分子和肿瘤抗原肽的复合物而产生的特异性杀伤效应。存在的问题：①有些肿瘤细胞上的 MHC-Ⅰ类分子表达低下或缺乏，使细胞毒性 T 细胞（cytotoxic T lymphocyte，CTL）无法识别肿瘤细胞。有研究采用人类白细胞抗原（human leukocyte antigen，HLA）Ⅰ类分子的抗体进行免疫组化检测，发现许多病例存在 HLA-Ⅰ类分子的缺失。此外，临床研究发现星形细胞瘤虽然表达 HLA-Ⅰ类分子，然而涉及抗原加工、转运和伴随的一些分子。如潜伏膜蛋白 2（latent membrane protein 2' LMP2）、抗原加工相关转运蛋白 1（transporter of antigen processing-1，TAP1）在恶性程度高的肿瘤中表达显著降低，使肿瘤细胞形成无结合肽的 MHC-Ⅰ类分子。这种空载的 MHC-Ⅰ类分子不仅妨碍了 CTL 对肿瘤的识别，它与自然杀伤（natural killer，NK）细胞的杀伤细胞免疫球蛋白样受体（killer cell immunoglobulin-like receptor，KIR）结合，也关闭了 NK 细胞对其杀伤。②许多肿瘤及免疫细胞表达 B7 家族成员的程序性死亡因子配体 1（programmed death ligand 1，PD-L1 又称为 B7-H1、CD274），它与 T、B 细胞上的程序性死亡因子 1（programmed death 1，PD-1）结合后抑制机体的特异性细胞免疫和体液免疫，诱导特异性 CTL 程序性死亡。③MHC-Ⅰ链相关分子 A（MHC class Ⅰ chain related mol-

ecule A，MICA）通常表达在多种恶性肿瘤上。MICA 通过与其受体 NKG2D（natural-killer group 2，member D）相互作用激活 NK 细胞和协同刺激 T 细胞。然而，肿瘤组织形成的乏氧环境促使 MICA 脱落；此外，肿瘤细胞高表达的基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinase，MMP）切割 MICA 胞外区形成可溶性 MICA 分子，进而封闭 $NKG2D^+$ T 细胞和 NK 细胞的抗肿瘤作用。④T 细胞可以通过表达的 Fas 配体（Fas ligand，FasL）杀伤 Fas^+ 的肿瘤细胞。但是，肿瘤细胞表达的 FasL 及其分泌的含有 FasL 的外泌小体（exosomes）可与 T 细胞上的 Fas 结合，诱导 T 细胞程序性死亡。⑤患者体内的肿瘤细胞和免疫细胞可产生多种免疫抑制因子，如转化生长因子-β（transforming growth factor-β，TGF-β)、白介素（interleukin，IL）10、前列腺素 E_2（prostaglandin E_2，PGE_2）等，可抑制抗肿瘤免疫。例如，TGF-β 既能促进肿瘤生长，又能抑制淋巴细胞的增殖、分化，甚至诱导其程序性死亡。有临床研究显示，肿瘤疫苗免疫治疗后绝大多数患者 TGF-β 水平仍然较高。⑥肿瘤细胞表达的 HLA-E、HLA-G 及其游离的分子对 T 细胞和 NK 细胞均可产生明显的抑制作用。肿瘤细胞可以通过表达的 HLA-E 与 T 或 NK 细胞上的抑制性受体 CD94/NKG2A 结合，从而抑制其杀伤作用。IFN-γ 是抗肿瘤的重要细胞因子，然而它可上调肿瘤细胞表达的 HLA-E 和 HLA-G。肿瘤的乏氧环境可促进 HLA-G 的表达。HLA-G 还可促进 Th2 类因子（如 IL-10、IL-4、IL-3）的产生，干扰了抗肿瘤免疫。⑦在肿瘤患者血液和肿瘤组织中调节性 T 细胞（regulatory T cell，Treg）明显增多。Treg 诱导抗原提呈细胞（antigen presenting cell，APC）表达 B7-H4，进而抑制 T 细胞的增殖；活化的 Treg 释放穿孔素或粒酶直接杀伤 T 细胞和 APC；Treg 表达的细胞毒性 T 细胞 4（cytotoxic T-lymphocyte antigen 4，CTLA4）诱导 APC 表面吲哚胺 2，3 双加氧酶（indoleamine 2，3-dioxygenase，IDO）的表达，后者通过增加色氨酸代谢而抑制 T 细胞的活化；Treg 释放 TGF-β 和 IL-10 等免疫抑制因子，抑制 APC 的 MHC、CD80、CD86、IL-12 等分子表达，破坏了 APC 功能，抑制了 T 细胞的活化。⑧在肿瘤微环境中肿瘤相关巨噬细胞（tumor associated macrophage，TAM）一方面直接促进肿瘤生长和侵袭，同时在肿瘤局部低氧的微环境中，TAM 也能通过分泌 PGE_2、IL-10 和 IDO 代谢产物抑制 T 和 NK 细胞活化与增殖。有临床研究显示，肿瘤疫苗免疫后，Treg 并没有明显减少。⑨髓源性抑制细胞（myeloid-derived suppressor cell，MDSC）来源于骨髓祖细胞和未成熟髓细胞。正常情况下，该群细胞可以分化为树突细胞、巨噬细胞和（或）粒细胞。但在肿瘤组织和患者的外周血中 MDSC 数量和比例均有大幅度的增加，且与肿瘤的大小和恶性程度有一定的相关性。MDSC 可诱导 Treg 细胞的产生，能在肿瘤微环境中分化为 TAM，产生多种免疫抑制效应。至今，肿瘤逃逸机制仍在不断深入研究。

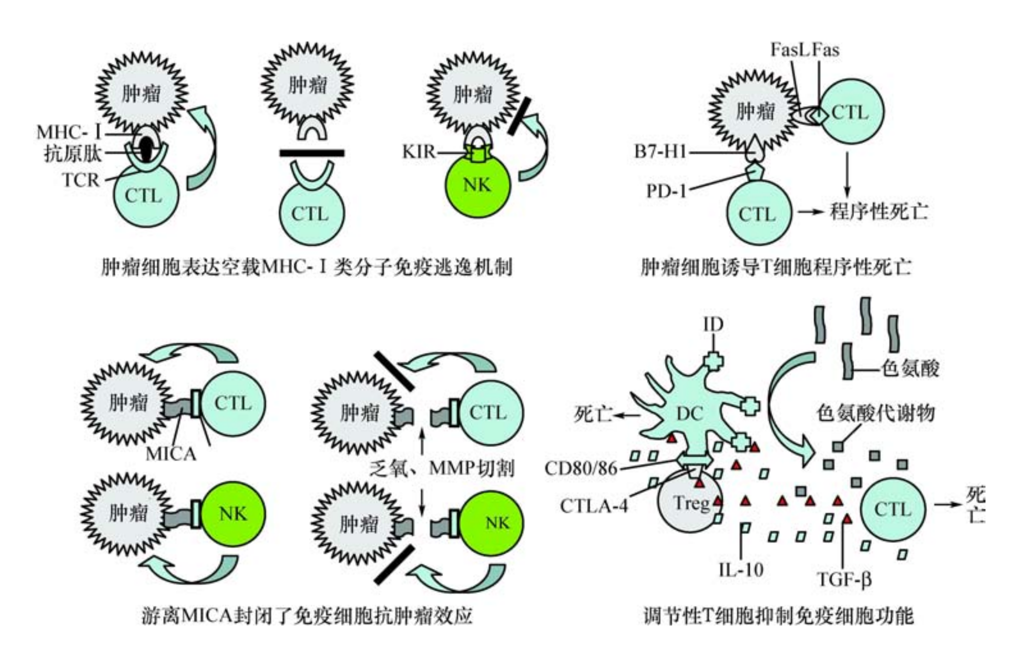


图 1 肿瘤免疫逃逸机制示意

近期美国已批准转基因个体化细胞疫苗（sipuleucel-T）用于晚期前列腺癌的治疗。临床研究结果显示该疫苗与对照组相比可延长患者平均生存期达 4 个月之久。这是肿瘤疫苗研究的重要转折点，它已得到临床研究的认可。肿瘤疫苗疗法可增强抗肿瘤特异的免疫记忆，与其他常规治疗方法有互补性，但其疗效仍然有待提高。目前，人们已意识到只有有效地对抗肿瘤逃逸机制，才有可能大幅度提高肿瘤疫苗的治疗效果。为了对抗 Treg 的抗肿瘤免疫抑制效应，有人将抗 CD25 和抗 CTLA-4 抗体与肿瘤疫苗联合应用，可提高 IFN-γ 和肿瘤特异性 CTL 的产生，并显著提高了无瘤生存期。抗 CTLA-4 抗体的临床研究也显示出抗肿瘤治疗效果，但也产生了明显的自身免疫反应的毒副作用。IL-10 的 siRNA 导入肿瘤细胞制备瘤苗可提高免疫效果。用抗体封闭 B7-H1 也可以提高肿瘤疫苗免疫效果。应用 HLA-E、HLA-G 的抗体或其可溶性配体封闭它们的抑制作用，有可能提高瘤苗的免疫效应。人们还发现环氧合酶-2（cyclooxygenase-2，COX-2）抑制剂不仅可以抑制 PGE_2 的产生，还可抑制 IDO 表达，可改变肿瘤微环境的免疫抑制，它与肿瘤疫苗联合应用显著提高了免疫治疗效果。对抗 TGF-β 也有多种方法，应用 TGF-β 的反义寡核苷酸、抗体和小分子药物均可提高抗肿瘤效应。然而，TGF-β 有多种亚型，因此肿瘤疫苗与针对多种亚型制剂的联合应用可能会进一步提高疗效。此外，封闭 TGF-β 受体同样会增强抗肿瘤免疫效果。TGF-β 反义核苷酸修饰的瘤苗已进入临床研究；如何对抗肿瘤微环境中的 TAM 和 MDSC 等也处于探索之中。

肿瘤免疫逃逸涉及众多因素，这为临床提高肿瘤疫苗的免疫治疗效果带来了困难。此外，肿瘤的不均一性，以及患者免疫状况的个体差异，都需要有针对性地检测和采用相应的治疗策略。对抗肿瘤逃逸的手段，既要能提高抗肿瘤效果，又不能产生严重的自身免疫和毒副作用。未来的肿瘤疫苗设计本身可以融入一些对抗肿瘤逃逸机制的成分，而更为便捷和有效的方法可能是针对患者的具体肿瘤逃逸因素的联合疗法。在众多问题中是否能找到几种关键性的因素，并采用相应对策构建肿瘤疫苗或与肿瘤疫苗联合应用，从而大幅度提高治疗效果，人们在拭目以待。

参考文献

Aled Clayton, J Paul Mitchell, Jacquelyn Court, et al. 2008. Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. J Immunol, 180: 7249～7258

Asim Sahal, Chatterjee S K. 2010. Combination of CTL-associated antigen-4 blockade and depletion of $CD25^+$ regulatory T cells enhance tumour immunity of dendritic cell-based vaccine in a mouse model of colon cancer. Scandi J Immuno, 71: 70～82

Eyad Elkord, Adam Dangoor, Deborah J Bur, et al. 2009. Immune evasion mechanisms in colorectal cancer liver metastasis patients vaccinated with TroVax (MVA-5T4). Cancer Immunol Immunother, 58: 1657～1667

Gargi D Basu, Teresa L Tinder, Judy M Bradley, et al. 2006. Cyclooxygenase-2 inhibitor enhances the efficacy of a breast cancer vaccine: role of IDO. J Immunol, 177: 2391～2402

Janice M Reichert, Julia B Wenger. 2008. Development trends for new cancer therapeutics and vaccines. Drug Discovery Today, 13 (1～2): 30～37

Laurent Derre, Murielle Corvaisier, Be′atrice Charreau, et al. 2006. Expression and release of HLA-E by melanoma cells and melanocytes: potential impact on the response of cytotoxic effector cells. J Immunol, 177: 3100～3107

Matthias Mehling, Perikles Simon, Michel Mittelbronn, et al. 2007. WHO grade associated downregulation of MHC class I antigen-processing machinery components in human astrocytomas: does it reflect a potential immune escape mechanism? Acta Neuropathol, 114, 111～119

Nagathihalli S Nagaraj, Pran K Datta. 2010. Targeting the transforming growth factor-β signaling pathway in human cancer. Expert Opin Investig Drugs, 19 (1): 77～91

Stephen H Wrzesinski, Yisong Y Wan, Richard A Flavell. 2007. Transforming growth factor-β and the immune response: implications for anticancer therapy. Clin Cancer Res, 13 (18): 5262～5270

Webster W Scott, Thompson R Houston, Harris Kimberley J, et al. 2007. Vaccine responses reactivated by tumor cell improvement of antitumor memory inhibitory mechanisms for targeting molecular and cellular. J Immunol, 179: 2860～2869

撰稿人：张叔人
中国医学科学院肿瘤医院

自身免疫性疾病能用疫苗治疗吗

Can Autoimmune Disease Be Treated with Vaccine

治疗性疫苗旨在打破机体的免疫耐受或免疫亢进状态，为肿瘤、慢性感染性疾病、自身免疫性疾病的治疗提供新方法，其复杂程度远远超出了传统的预防性疫苗。治疗性疫苗可以分为两大类：一类是用于治疗慢性感染和肿瘤的治疗性疫苗，是为了激发细胞免疫应答，以清除被感染的细胞或肿瘤细胞；另一类是治疗自身免疫性疾病的治疗性疫苗，以诱导免疫耐受为主要目的。本文将阐述自身免疫性疾病治疗性疫苗的研制难点。

自身免疫性疾病（autoimmune disease，AID）是机体免疫系统对自身成分发生免疫应答而导致的疾病状态，是自己或非己识别的免疫耐受基本过程中异常调节的结果。根据自身免疫应答所针对的靶抗原分布，可将其分为器官特异性或器官非特异性自身免疫性疾病。自身免疫性疾病可使用免疫抑制剂、抗炎药物、细胞因子、特异性抗体和口服自身抗原等方法进行治疗，这些治疗方法在减少克隆扩增和改变早期信号途径方面很有效。然而，一旦自身免疫应答建立，对已分化的 T 细胞亚群或者在炎症反应部位起作用来消除靶组织免疫应答的免疫干涉作用变得不那么有效，因而人们在不断寻找更加有效、针对性强、安全性好的治疗方法。自身免疫性疾病的治疗性疫苗应该能够消除自身抗原特异的自发免疫应答，而不干扰针对其他抗原的免疫应答。虽然针对多发性硬化患者的 Cop1 已经应用于临床，但是研制真正广泛有效的治疗自身免疫性疾病的疫苗还面临着巨大挑战，主要的难点在于引起自身免疫反应的抗原表位的确证及自身反应 T 细胞的受体（T cell receptor，TCR）库的定性。

与疫苗防止细菌和病毒感染显然不同的一点是，前者可直接选用已经确定的微生物中有免疫原性的分子作为疫苗。对于自身免疫性疾病疫苗无论是研制多肽疫苗还是 DNA 疫苗，研究的中心环节都是确定以何种分子作为抗原。自身免疫病研究的第一步是确定病变器官中的何种组织抗原是受免疫攻击的靶点。无论是在关节炎或是糖尿病，已经报道的与致病可能相关的这种分子日益增加。就脑脊髓炎而言，能攻击致病的自身细胞可能与髓鞘碱性蛋白等一系列神经系统中的蛋白质有关。显然，从何种蛋白质着手是个棘手的问题。此外，在纯种动物中已经发现不同种类的动物对不同来源的自身抗原更敏感，提示了在人类疾病中，不同的患者可能会因不同的自身抗原致病。也无法排除，有些患者可能有多种自身抗

原对病情的加重起到了协同作用。

抗原表位可以通过精密运算进行预测，也可以通过从负载抗原的抗原提呈细胞（antigen-presenting cell，APC）表面的主要组织相容性复合体（major histocompatibility complex，MHC）进行洗脱获得。然而通过这种方法鉴定的抗原表位在进行自身免疫性疾病疫苗研制时可能无效，因为这种通过洗脱获得的表位有可能并不与 MHC 发生适当的结合。在自身免疫性疾病中作为耐受原的多肽必须模拟自然提呈表位。

自身免疫病造成的组织损伤与自身抗原特异性 T 细胞应答密不可分，防止自身免疫性疾病的有效措施之一是阻止自身反应性 T 细胞的激活。由于 T 细胞识别的过程与 B 细胞完全不同，它们的识别涉及 MHC 以及经 APC 加工产生的特异性抗原决定簇。防止自身反应性 T 细胞侵犯的手段之一就是通过研究和鉴定自身抗原与 T 细胞相互作用的决定簇，以及与其功能有关的特定氨基酸序列，从而研究出一种与决定簇结构近似但功能却完全相反的合成多肽，这种多肽可以防止自身抗原对反应性 T 细胞的激活作用。然而有拮抗功能的多肽在体内产生的生物效应则比设想的竞争和对抗更为复杂。比如有研究发现，一个关键氨基酸的替换仍然可能会激活原先的 T 细胞。但是在新的多肽刺激下，该种 T 细胞会表达出不同的功能。

新合成的多肽中有相当一部分其本身具有免疫反应的刺激作用，甚至会诱发对疾病无益而有害的反应。例如对非致病细胞群体产生刺激作用而使它们转化称为致病细胞；也可能诱发了过量细胞因子的生成，从而增加了使疾病发展的条件。

这一研究领域的任务是寻找新的多肽，而这种多肽有预防疾病的功能，但又不至于伴生与疾病无益的免疫反应。由于免疫系统本身结构复杂，而且在遗传因子的控制下，个体差异又大，要研制对于不同遗传背景的患者都有益而无害的肽类制剂仍然任重道远。

由于发病机制的多样性、患者个体差异的显著性，以及致病细胞的异质性，越是特异的治疗就越可能在一部分患者中有显著疗效，而在另一部分患者中则不奏效。个体化疫苗即从自身组织细胞中获得相关抗原制备而来的、具有患者针对性的疫苗，该种疫苗的治疗优势相对突出，因为这是针对每一例患者进行的特异性治疗，不需要对提取抗原等进行较为深入的研究，且疗效亦相对令人满意，但其具有生产成本高、扩展性低、不良反应的出现、生产中严格的无菌状态及颇为复杂的审批过程等在内的诸多因素均限制了这一类疫苗的发展。

随着对人类自身免疫性疾病的研究深入，治疗性疫苗将成为自身免疫疾病的有效治疗方法。免疫应答中对致病细胞和保护性细胞最有效的处理可能最后依靠以抗原为基础的和以细胞因子及以 T 细胞为基础的治疗方法的组合，或者可能

依靠其他免疫调节剂选择性地靶向自身反应性 T 细胞，并使自身反应性 T 细胞偏离自身进攻反应。因此，未来治疗性疫苗的发展应该注重靶向不同致病过程的方法的组合治疗，这将有助于更加全面地探索治疗性疫苗在治疗自身免疫疾病方面的潜力。

参 考 文 献

李忠明 . 2004. 当代新疫苗 . 北京 :高等教育出版社 ,688～694

David C. Wraith. 2009. Therapeutic peptide vaccines for treatment of autoimmune diseases. Immunol Lett, 122(2):134～136

Mark P, Elizabeth JS, Tobias L, et al. 1999. Naturally processed and presented epitopes of the islet cell autoantigen IA-2 eluted from HLA-DR4. J Clin Invest ,104 : 1449～1457

Viner NJ, Nelson CA, Deck B, et al. 1996. Complexes generated by the binding of free peptides to class II MHC molecules are antigenically diverse compared with those generated by intracellular processing. J Immunol ,156 : 2365～2368

撰稿人 :沈心亮　徐　静

北京生物制品研究所

如何选择疫苗接种方式

How to Choose the Mode of Immunization

把疫苗送入机体相当于运载火箭将卫星投送到预定轨道上一样，应将疫苗投递到机体中可以发挥最大免疫功效的地方。目前大部分的疫苗都是通过注射方式注入体内。但疫苗一定要注射吗？

早在南宋时期（公元1200年左右）中国的医生发明了“人痘接种术”，即将天花病死者身上的结痂“痘”取出，吹入健康人的鼻腔中，也有健康小儿穿1～2天轻型天花患者的内衣，使其感染轻型天花达到预防作用。500年后英国的Jenner医生利用牛痘进行针刺的方法给人进行接种而患牛痘，接种者产生了牛痘抗体可以抗天花感染，这些都是感染免疫。

疫苗有灭活疫苗与减毒活疫苗两类，减毒活疫苗是以接近自然感染的方式将减毒的病原接种到人体，使被接种者形成隐性感染，或出现轻微的临床症状或无症状，而产生特异性的免疫。灭活疫苗多采用皮下或肌内等注射的方式，使疫苗进入体内，疫苗中的抗原分子刺激免疫细胞而产生特异性免疫。但随着免疫学的发展，灭活疫苗的广泛应用，如何使进入体内的抗原产生最佳效果受到重视。更为重要的是注射接种方式，无法使有些抗原达到预期的预防效果。虽然提高疫苗的免疫原性、对抗原进行纯化、佐剂的使用等可以提高免疫效果，但接种方式也是重要的因素之一。较纯的抗原往往用常规皮下或肌内注射方法，但效果欠佳。人们开始尝试使用其他更为简单、方便的形式进行接种疫苗，如鼻腔接种、口服接种等黏膜途径。

黏膜组织是接受疫苗的理想场所，而且黏膜组织是防御病原物进入的第一道防线，其中存在着大量的免疫细胞和友好微生物作为抗感染屏障，所以将疫苗投递到此系统中将会产生理想的保护效果。虽然，黏膜系统是理想的疫苗投递途径，由于黏膜内含有丰富的分泌黏液的细胞，能产生大量分泌物，使黏膜表面（如鼻腔）覆有一层随纤毛运动不断移动的黏液层，使得疫苗无法接近黏膜组织细胞，而且黏液层的清理能力极强，很快疫苗等物质被清理干净。而通过口服的疫苗很容易被胃酸破坏；另外一个重要方面，黏膜组织是一高度免疫耐受的组织，尤其是通过口腔胃肠组织，一般情况下，在此很难能激发起免疫反应。然而，黏膜组织耐受有着重要的生物学意义，举一个简单例子可以说明其重要性。当我们每天吃牛肉时并不能因为牛肉是外源物质，会对牛肉产生免疫反应，而是

恰恰相反，机体非但没有产生免疫反应，而是充分地消化了牛肉的有效成分。但在极少的情况下，机体对食物产生了免疫反应，而此种情况临床上叫食物过敏。由此而知，大部分疫苗进入黏膜后除了被破坏和清除外，重要的是疫苗进入黏膜后无法达到有效激活免疫反应的效果。

既然黏膜免疫是首选的接种疫苗途径，主要研究难题应是如何使黏膜组织能接受外来的抗原而不被清除，同时又能激活其免疫反应。针对这些科学难题，科学家们目前从几个方面进行研究。首先，通过对黏膜免疫器官和细胞的研究发现，希望找到可以使抗原有效进入黏膜的免疫系统中，并可以发挥作用的突破点。近年来，人们发现了黏膜组织中有一种特定的黏膜细胞（M 细胞），它主要承担采集抗原并将其直接输送到黏膜免疫系统的任务。进一步发现其细胞上一些特殊的受体及与其结合的配体，利用抗原与这些配体融合后，科学家们证明了外来抗原可以更有效地进入黏膜组织并激活其免疫反应。近年来，在开展黏膜免疫耐受研究中，人们发现了黏膜产生免疫耐受的一些机制，如肠道中存在一种调节性 T 细胞（Treg），它在黏膜免疫耐受中扮演了极为重要的角色。深入研究调节性 T 细胞的发生、发展和转化规律，将对今后有效地降低调节性 T 细胞细胞活性，打破黏膜免疫耐受，开发有效的黏膜途径疫苗起到积极作用。这些基础理论问题解决之后，相应的技术问题仍然很多，如疫苗配制、效果评价和检测方法等，可逐个按实际情况解决。

最近，科学家们也在开发通过皮肤吸收达到激活免疫反应的疫苗接种方式。虽然利用此方式的一个好处是不需要对疫苗本身做太多的保护修饰，但是通过皮肤接种疫苗的最大障碍是要克服皮肤上角质层阻挡疫苗进入的屏障。

近年来，纳米材料研究和发展给疫苗黏膜和皮肤接种提供了新型的材料和可行性。首先，纳米材料由于颗粒微小，更容易进入黏膜组织，或通过皮肤的角质层进入皮肤细胞。另外，利用各种化学修饰，可以使纳米疫苗更容易黏附在鼻黏膜表面不被清除，或通过口服进入胃后可以抵抗胃酸破坏。同时，也可以在纳米材料中加入一些佐剂成分增强疫苗激活有效免疫反应的能力。

一旦解决此难题，今后的疫苗不必再到医院进行注射，只需在家把疫苗通过口服、吸入鼻中或者贴在手臂上的方式，就可达到预防疾病的效果。

参考文献

Lawson LB, Freytag LC, Clements JD. 2007. Use of nanocarriers for transdermal vaccine delivery. Clin Pharmacol Ther, 82: 641

Lloyd Mayer. 2003. Mucosal immunity. Pediatrics, 111: 1595

Neutra MR, Kozlowski PA. 2006. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. Nat Rev Immunol, 6: 148

Shimon Sakaguchi, Fiona Powrie. 2007. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. Science, 317: 627

Victoria Sebbage. 2009. Cell-penetrating peptides and their therapeutic applications. Bioscience Horizons, 2: 64

撰稿人：王　宾
中国农业大学

未来基因工程疫苗“工厂”

Promising Factory for Vaccine Production

随着一些新发传染病和病原的不断出现，疫苗研发作为防控传染病最有效的手段而备受重视，而传统的疫苗制造方法和理念已远远不能满足当前对新疫苗研发的迫切要求。因此，还有许多传染病的疫苗可能需要通过基因工程手段进行研究开发，这也是今后疫苗发展的一个方向。

基因工程疫苗是指使用重组 DNA 技术克隆并表达保护性抗原基因，利用表达的抗原产物或重组体本身制成的疫苗，主要包括基因工程亚单位疫苗、基因工程载体疫苗、核酸疫苗、基因缺失活疫苗及蛋白工程疫苗。无论采用何种形式，最终发挥作用的组分都是具有免疫原性的抗原蛋白。但不同的抗原蛋白的表达和投递形式有各自的优势和劣势。在疫苗研发行业目前普遍面临的难题是缺乏高效的疫苗抗原生物合成载体，这种载体应该满足抗原蛋白表达量高、生产工艺便捷、最终的疫苗产品安全高效的研发要求。题目中所提到的基因工程疫苗“工厂”就是指用来稳定高效表达基因工程疫苗抗原的生物载体系统。

从疫苗研发和制造的基本要素来分析，目前基因工程疫苗研发中的一些优劣势主要表现在抗原的表达量、抗原蛋白在载体中翻译后的加工修饰方式、疫苗安全性认证及疫苗产量和制造成本等指标方面。就以现今公认最安全且较成熟的基因工程亚单位疫苗为例，这种疫苗制造所能采用的表达系统主要有原核表达系统和真核表达系统。原核表达系统产生的抗原蛋白表达量大、生产过程简单、成本低廉，但由于原核系统的蛋白翻译和加工相对简单，没有对表达终产物的修饰，而这种修饰的缺失对抗原蛋白来说是至关重要的，会导致抗原免疫效率的下降。真核系统虽然在抗原蛋白的翻译后修饰和加工方面远远优于原核系统，但表达量较低，生产成本高，工艺相对复杂。而用表达保护性抗原的重组微生物做成的载体疫苗在疫苗安全性认证方面也面临着诸多困难。

近年来，随着动植物转基因技术的不断发展，人们将寻找抗原表达理想载体的焦点转移到可食性植物和动物身上，这也为未来疫苗的发展开辟了一条新的途径，目前已有数百篇相关动植物疫苗反应器的研究结果论文被公布。研究人员将疫苗候选抗原基因转入水果、蔬菜及动物体中，将转基因动植物作为疫苗生物反应器，使疫苗抗原蛋白在植物或动物体内得到表达。人们通过食用水果蔬菜、鸡蛋或动物乳汁等，得到相应的免疫接种。这种方法省去了疫苗抗原的纯化、制造

厂房的修建和认证过程，大大地降低了疫苗的研发生产周期和制造成本。

在一些植物疫苗的研究中发现，植物天然的细胞壁就可以保护疫苗抗原蛋白免受人体胃部消化液的消化，并能模拟脂质体或微囊结构的作用，使疫苗抗原成分在下消化道得到缓慢释放。因此，这类疫苗可以通过口服途径就能很好地刺激机体产生相应的免疫反应，从而达到疫苗的保护效果。相对植物疫苗，动物体内的蛋白质翻译和加工过程更加完善，因此也可以通过转基因技术将疫苗抗原基因转入像牛、猪、羊、鸡、蚕等动物体内，使其在一些器官中稳定表达，再以乳汁、唾液、卵蛋白等不同形式供人们接种使用，而这时的接种可能就已经超越了传统意义上的疫苗接种。它可以是多种形式的一种无针式接种，在提高疫苗效率的同时也会减轻给疫苗接种者带来的痛苦。尽管上述转基因动植物疫苗、活载体疫苗等未来疫苗的研究热点都代表了疫苗发展的方向，但这些疫苗还存在诸如伦理学和生物安全及技术不成熟等诸多问题。

综上所述，基因工程疫苗研发的现状并不像一些人认为的那样乐观，因为就疫苗研发的要素而言，目前的水平还远没有达到一种理想的标准，而且解决这些难题可能还有很长的路要走。因此，我们在憧憬未来疫苗的同时还需进一步加快疫苗抗原生物合成高效载体的研究。换而言之，就是加快寻找和建立理想的基因工程疫苗“工厂”。只有解决了这个难题，在我们遇到用传统方法无法研制疫苗的病原体或新发传染病时才能做到胸有成竹、沉着应对。

参考文献

Houdebine LM. 2009. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. Microbiology and Infectious Diseases ,32(2):107～121

Larrick JW , Thomas DW. 2001. Producing proteins in transgenic plants and animals. Current Opinion in Biotechnology ,12(4):411～418

Schillberg S , Twyman RM , Fischer R. 2005. Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plants—technology assessment. Vaccine ,23(15):1764～1769

Sharma AK , Sharma MK. 2009. Plants as bioreactors : recent developments and emerging opportunities. Biotechnology Advances ,27(6):811～832

Tiwari S , Verma PC , Singh PK , et al. 2009. Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. Biotechnology Advances ,27(4):449～467

撰稿人:李启明
北京生物制品研究所

人体器官的再造与功能的实现

Remodeling and Functional Construction of Human Organs

自古以来，人类就有这样一个设想：如果身体的某一个器官出现缺失或严重功能障碍，能不能像机器更换零件一样替换病损的器官？答案是肯定的。生命科学、材料科学及工程科学的发展，促进了一门新兴的交叉学科——组织工程学的诞生，它的出现为人类实现制造人体器官，建立“人体配件工厂”，从根本上治疗由组织、器官缺失及功能障碍所导致的各类疾病带来了新的希望。组织工程的基本原理是将体外培养、扩增的正常组织细胞，吸附于一种生物相容性良好、可降解并被机体吸收的生物材料上，形成两者的复合体，将细胞-生物材料复合体植入受体组织、器官病损部位，细胞在生物材料逐渐降解被机体吸收的过程中，形成新的具有特定形态和功能的相应组织或器官，从而达到修复创伤和重建功能的目的。再造人体组织和器官的功能化是组织工程研究的核心任务之一，同时也是组织工程技术优势特色所在。体外再造人体器官整合了生物材料科学和细胞生物学、组织与胚胎学、发育生物学、生理学等生命科学的重要领域，吸收利用前沿科学的最新理论研究成果和创新技术手段。而组织器官发育过程、结构特征及功能实现的多样性和复杂性决定了目前体外再造人工器官尚有诸多重要的科学问题亟待阐明。研究器官体外构建所涉及的种子细胞、支架材料、体外培育环境、组织建构及微网络系统重构等主要影响因素及其之间的相互关系，把握种子细胞及与生物支架材料形成复合体的可控发育分化规律机制，了解体内微环境对人工器官结构和功能重建的影响。这些基本理论的揭示有助于更好地理解组织器官发育的一般规律，明确人工组织器官体内分化与正常器官发育的异同，为人工器官功能的完整发挥提供理论依据，并为最终实现人工器官的“按需定制”及“个体化”临床修复治疗奠定基础。

针对结构性人体组织再造的组织工程研究进展最为迅速，所构建的相应组织器官具有与在体组织器官基本相似的结构与功能，尤以组织工程化皮肤、软骨研究最具代表性。其中，组织工程化皮肤是最先面市的组织工程化产品。Apligraft（又称 Graftskin）是第一种商品化的既含有表皮层又含有真皮层的组织工程化皮肤，现在已经在加拿大和美国获准用于临床治疗静脉性溃疡。在软骨再造研究方面，美国 Genzyme 公司以自体软骨细胞构建的人工软骨 Carticel™ 已经进入产业化阶段，接受治疗的患者中，约 90% 膝盖功能改善，疗效可长达 10 年以上。德

国 Verigen 公司的产品——基质诱导自体软骨细胞移植（MACI）已在许多国家成功实施了近 2000 例软骨修复治疗，患者症状在 6 个月内均得到改善，无明显并发症。除上述结构性人体组织再造研究取得进展外，近年来针对重要生命器官再造的研究也相继取得突破。其中，针对结构相对简单的膀胱再造研究进展最为明显，体外再造的膀胱具有近似于体内膀胱的正常功能，并获准在美国进行临床试验。1999 年，由美国 Wake Forest 大学的 Atala 教授带领的研究小组将体外再造的人造膀胱成功用于犬膀胱缺损修复。结果表明，术后修复的膀胱容量增大，且可以形成拥有尿路上皮、黏膜下层和肌层等三层正常组织结构，并具有排尿功能。2006 年，他们又成功将人造膀胱植入患者体内，7 名接受治疗的患者尿液渗漏情况好转，再造膀胱能够更好地发挥储存尿液的功能。然而，人体复杂器官从发生、发育到行使正常的生理功能，无不受到一系列基因的调控和内环境的影响。研究种子细胞多组织协同发育和整合的内在规律，以及仿生微环境对种子细胞体外自我更新、扩增和向所构建组织细胞分化的调节机制是成功实现人工器官功能重建的理论难题。以目前的研究手段来看，人工器官的制备尚面临诸多的技术难点，包括拓展组织工程细胞来源、维持其在连续传代过程的特异性、支架材料功能仿生制造、组织器官微网络系统的建立等。从组织器官发育及分化调控规律的阐明、智能生物材料的研发，到建立人工器官完备的功能体系、最终实现人工器官临床应用，还要经历一段相当艰难的研究道路。由于上述科学难题的存在，若要以人工组织器官进行体内修复，就必然采取阶段性突破的办法，逐步予以解决。第一步，在种子细胞方面寻求新的突破。依据发育生物学的理论与实践，实现各种类型干细胞的定向诱导分化，形成不同组织类型的细胞。目前干细胞来源的组织工程种子细胞已经广泛应用于组织工程器官制造的各个领域。尤为值得关注的是从骨髓、血液、大脑、肝、肌肉、皮肤及脐血中提取出的成体干细胞具有体外扩增及多向分化潜能，并有良好的可塑性，且来源广泛，现已成功用于构建组织工程器官。同时，进行体内微环境体外模拟与再现。以提供体外组织再造的良好微环境为目标不断优化各种生物反应器及微载体系统培养体系，在培养微环境中应用多种细胞生长、分化调节因子和程序性死亡抑制剂，促使种子细胞的大规模培养逐步得到完善。第二步，研制新一代有特定修复功能及干细胞定向诱导分化能力的“智能支架材料”，阐明生物降解材料和目标器官功能细胞的双向动态相互作用机制，探索采用分子仿生聚合物和功能基元自组装构建细胞外基质仿生支架的新途径，为采用细胞及其聚集体和三维细胞外基质仿生支架复合构建复杂器官提供材料学基础。第三步，以发育生物学与再生医学的研究为依据，发展更为先进的组织器官构建技术。生物打印机的出现就是人们对此一个非常好的尝试。2010 年，Invetech 公司和 Organovo 医学公司一起合作，成功研制出了一种 3D 生物打印机，通过这台打印机，将事先提取好的活体细胞，根据需

要进行组合排列，便能打印出所需要的组织，误差可以控制在 20μm。再以心肌组织工程为例，2008 年 Ott 等利用“去细胞化-再细胞化”的方法，通过冠脉灌注去垢剂对心脏进行去细胞化，形成一个由细胞外基质组成的无细胞的脉管结构、瓣膜和完整的腔室结构，随后在这种无细胞结构上接种心肌细胞或内皮细胞，并通过生物反应器培养 4 周，成功在体外复制出一个具有一定泵血功能的工程化心脏组织。随着生物学、医学、材料学及工程学的发展与相互交融，组织工程学不断取得新的突破，人类有望最终实现人体器官制造的梦想。期待有一天，患者可以根据病情的需要有机会选择定制并且更换自己的器官。再造人体组织器官这一美好梦想正在向我们的现实生活走来。

参考文献

Daniel Howard, Lee D Buttery, Kevin M Shakesheff, et al. 2008. Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. J Anat, 213 (1): 66～72

Guillot PV, Cui W, Fisk NM, et al. 2007. Stem cell differentiation and expansion for clinical applications of tissue engineering. J Cell Mol Med, 11 (5): 935～944

Lesman A, Habib M, Caspi O, et al. 2010. Transplantation of a tissue-engineered human vascularized cardiac muscle. Tissue Eng Part A, 16 (1): 115～125

Marklein RA, Burdick JA. 2010. Controlling stem cell fate with material design. Adv Mater, 22(2): 175～189

Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, et al. 2008. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. Nat Med, 14 (2): 213～221

撰稿人：王常勇　王　妍　王海滨

军事医学科学院基础医学研究所

如何修复人体器官缺损

How to Repair the Defect of Human Organs

自现代外科学诞生以来，由于各种因素导致的器官缺失和功能障碍，迫切需要给予及时的修复治疗进行功能重建。除临床上常规保守治疗措施外，器官移植是最重要的手段之一。然而，供体来源不足和免疫排斥反应这两大问题严重制约着器官移植的临床应用。如何从根本上解决组织器官损伤或缺失所造成的功能障碍，一直是生命科学界面临的巨大难题。1987 年，首次提出“组织工程”的概念，即运用工程科学和生命科学的原理与方法，从根本上认识正常和病理的哺乳动物的组织结构-功能关系，并研究生物学替代物以恢复、维持和改进组织功能。这一新兴学科的建立和发展为解决棘手的器官移植的缺陷问题带来了新的突破。

人体器官再造研究历经二十余年的发展，虽然部分组织工程产品临床应用取得了令人满意的治疗效果，但总体上讲仍然处于起步阶段，目前仅仅是达到了简单修复临床组织器官缺损的水平，针对重要生命器官缺失的修复、替代治疗，还有许多重要科学难题亟待解决。在应用人工组织器官进行临床治疗时，如何综合分析器官病变或缺损的病因、类型、损伤程度、范围大小等因素，兼顾病情的多样性、复杂性和患者的个体化而设计最为合理有效的修复治疗策略是研究人员面临的突出难题。对于组织工程种子细胞在体内分化过程中的演变规律的理解和把握，精确实现种子细胞的定向分化调控，同时比较这些组织工程器官在完成修复过程中与正常组织发育、再生及创伤修复等生理、病理现象的异同点，进而明确影响组织工程化组织形成与成熟过程的相关影响因素及相关作用机制，这些基本科学问题的揭示是提高组织工程移植物体内存活率和治疗有效率，进而推动整个组织工程学科基础理论与临床应用发展的关键。

组织工程的种子细胞是构建人工器官的功能基元，以往人体器官再造中使用的种子细胞均存在一定的局限性。近年来，诱导型多能干细胞（induced pluripotent stem cells，iPS 细胞）理论与实践研究取得的突破性进展，使获得患者特异性的多能干细胞成为可能。iPS 细胞的问世不但解决了胚胎干细胞应用的伦理问题，而且因其来自于患者本身，从而避免了移植后产生免疫排斥反应的问题。更为重要的是，可以根据患者的病情与病程特点建立基于“个体特异性”或“疾病特异性”iPS 治疗策略，为“个体化医疗”向规模化治疗转化并最终实现组织工程技术产业化的目标奠定基础。尽管如此，iPS 细胞仍存在体内移植后的安全性

隐患，针对各种来源干细胞的深入研究有望为组织工程技术修复器官损伤或缺失提供更为适宜的种子细胞。同时，器官损伤的复杂性及人工组织器官功能的实现对组织工程学生物材料的特性提出更高的要求，新型的功能性复合材料、仿生材料、生物活性材料及智能型材料的研发势在必行。除了传统的可降解高分子聚合物，天然生物材料如各种脱细胞组织已被广泛地应用于各种相关组织的构建。在增强生物材料组织相容性的同时增强其生物降解效率，通过适当添加生长促进因子和分化调控因子，提高生物材料的生物学活性，促进干细胞增殖、诱导分化及新生组织形成。

细胞体内移植后的免疫排斥反应是制约组织器官修复的首要难题。以处于终末分化状态的自体细胞作为种子细胞，由于其来源有限，难以满足临床治疗需求，而异体或异种细胞，如软骨细胞、肝细胞等体内移植后，则存在明显免疫排斥反应。近年来，虽然干细胞研究发展迅速，但干细胞移植仍然受到不同程度的定向分化能力、引发免疫排斥反应，以及致瘤性、安全性等方面的限制。同时，现有器官制造手段的局限性也为人工器官体内移植带来诸多技术难点。体外再造组织工程化人体器官在厚度上仅能达到数百微米，这与人体器官正常厚度相比差距甚远，还无法对具有一定厚度的大体积的组织器官缺损进行修复。再造组织器官体内移植后，如何实现再血管化是组织工程产品进行临床治疗性应用所面临的又一基础性难题。重要生命器官的修复依赖于组织工程制造技术的发展和突破，需要采取阶段性推进的策略逐步实现。以心脏再造组织工程研究为例，1999 年美国、加拿大及欧洲的一些组织工程知名专家提出活体器官移植工程计划（Living Implants from Engineering，LIFE），希望在十年内复制出完整心脏。但因意识到再造完整心脏的技术复杂性和难度，目前研究人员已经将制造“完整心脏”这一理想目标过渡为再造“具有临床治疗功能的工程化心肌组织”这一现实目标。2006 年，Zimmermann 等对再造的工程化心肌组织施加力学拉伸刺激，成功构建出强烈收缩且高度分化的心肌组织，移植到动物体内可以形成较厚的心肌层，与天然心肌结构和功能相似，电偶联未发生延迟，没有出现心律不齐的现象。同年，我国研究人员首次成功应用胚胎干细胞作为种子细胞来源，应用不同生物支架材料，在体外构建出具有节律性收缩功能的工程化心肌条带组织，其在组织学、超微结构及电生理等方面表现出与天然心肌组织类似的特征。动物体内实验证实，这种策略构建的心肌移植物能够有效修复心梗缺损并且使心功能得到缓解。另外，目前研制的人工肾也是一个简单的功能单元，而并非完全具备肾脏的全部组织形态学特征。Yoo 等将肾脏细胞接种在多聚碳酸酯支架上并移植到受体动物体内，移植物中血管丰富，有肾小球样和肾小管样结构出现，并排出黄色液体，生化学检测证实了这种肾组织具有基本的肾脏生理结构，而且具备分泌和过滤的功能，可以排出机体体内的水分和代谢产物。

组织工程学是一门以“制造和替代人体组织与器官”为目的交叉学科，发育生物学和细胞生物学基础理论的发展必将推动人工组织器官体内分化发育机制研究。新的优质种子细胞的获取利用和新型仿生生物材料的筛选研制将大大降低人工组织器官体内移植的免疫排斥反应并提高其安全性。通过研究新生血管的形成规律，将内皮祖细胞等成体干细胞诱导成内皮细胞进而实现移植物表型转换，建立新生血管网络或采用原位移植组织工程血管等策略有望解决人工组织器官血管化的瓶颈问题。以上这些理论与技术方面所取得的研究突破无疑会促进组织工程器官的发展与应用，逐步向“按需定制、实现个体化修复治疗”的最终目标迈进。

参考文献

Graf T, Enver T. 2009. Forcing cells to change lineages. Nature, 462 (7273): 587～594

Guo XM, Zhao YS, Chang HX, et al. 2006. Creation of engineered cardiac tissue in vitro from mouse embryonic stem cells. Circulation, 113 (18): 2229～2237

Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. 2000. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. Proc Natl Acad Sci USA, 97 (7): 3422～3427

Langer R, Vacanti JP. 1993. Tissue engineering. Science, 260 (5110): 920～926

Lu WN, Lü SH, Wang HB, et al. 2009. Functional improvement of infarcted heart by co-injection of embryonic stem cells with temperature-responsive chitosan hydrogel. Tissue Eng Part A, 15 (6): 1437～1447

Murohara T. 2003. Angiogenesis and vasculogenesis for therapeutic neovascularization. Nagoya J Med Sci, 66 (1-2): 1～7

Park IH, Arora N, Huo H, et al. 2008. Disease-specific induced pluripotent stem cells. Cell, 134 (5): 877～886

Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, et al. 2008. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. Proc Natl Acad Sci USA, 105 (15): 5856～5861

Yoo JJ, Ashkar S, Atala A. 1996. Creation of functional kidney structures with excretion of kidney-like fluid in vivo. Pediatrics, 998: 605～608

Zimmermann WH, Melnychenko I, Wasmeier G, et al. 2006. Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. Nat Med, 12 (4): 452～458

撰稿人：王常勇　王　妍　刘志强

军事医学科学院基础医学研究所

基因疾病能够治疗吗

Can Genetic Diseases Be Treated

临床医生和生物学家对基因与疾病的关系进行了大量的研究，取得了重大进展，并逐步形成基因疾病这一新概念。基因疾病一般分为单基因疾病、多基因疾病和获得性基因疾病三大类。单基因疾病即与具有高度外显率的罕见单个基因突变有关的疾病，如罕见的酶缺陷疾病，呈孟德尔式的单基因遗传，又称孟德尔疾病。多基因疾病是由一个以上的基因引起，如高血压、冠心病、脑血管病、糖尿病、风湿病等，这些疾病同时也受生活方式、饮食结构、自然环境等多种因素的影响，发病机制复杂。多基因疾病对人类健康以及社会、家庭的危害极大。获得性基因疾病是由病原微生物感染引起，不会遗传，多是病原微生物基因与人体基因相互作用的结果，如艾滋病、病毒性肝炎等。这类疾病虽然不符合经典的遗传病概念，但大多数是病原微生物的基因组与人类基因组相互作用的结果，最终通过破坏人类基因的正常功能而使人体致病。事实上，人体内外环境因素的变化对基因结构、表达和基因功能的改变所产生的影响是不容忽视的。

无论单基因疾病，还是多基因疾病，单进行通常的临床药物治疗，不能从根本上治愈。随着分子生物学及其技术的发展，基因治疗为根治这些疾病带来了希望。

单基因疾病是目前最有希望通过基因治疗手段治愈的遗传病。以血友病为例，它是由于血液中凝血因子的缺乏而导致的严重凝血功能障碍。根据缺乏的凝血因子不同可分为血友病 A、血友病 B 及血友病 C。前二者为 X 染色体连锁隐性遗传，后者为常染色体不完全隐性遗传。目前治疗手段是直接给患者补充所缺失的凝血因子蛋白，以达到避免临床症状出现的目的，但这种疗法治标不治本。基因治疗将成为治本的有效手段。血友病基因治疗是通过基因转导的方法，将正常的凝血因子Ⅷ（FⅧ）或因子Ⅸ（FⅨ）编码基因分别导入血友病 A 或 B 患者体内，产生“基因替代”或“基因修复”作用，以纠正血友病基因缺陷，并持久分泌可满足止血需要的Ⅷ（FⅧ）或Ⅸ（FⅨ）蛋白，这将为根治血友病带来新的治疗手段和可能性。

多基因疾病既是影响世界上多数人体健康和生活质量的重要因素，也是长期困惑广大医务工作者和科研人员的难题之一。较之单基因疾病，多基因疾病的定位一直是一个尚未解决的难题。目前，像高血压、糖尿病这样的疾病到底有多少

相关基因尚不清楚，也不知道每个基因能在多大程度上影响疾病的发生，需要多少个基因的突变方能导致疾病的发生，而且多基因疾病的遗传模式也不符合孟德尔遗传规律。多基因疾病的发病机制是复杂的，是多基因、多因素和多环节相互作用的结果，因此单纯应用一种基因治疗很难奏效，必须根据多基因疾病发生的分子机制，采取多基因的综合基因治疗才可能取得良好效果。另外，对于同一类多基因疾病其发病原因可能不同，所涉及的基因亦不同，其诱发的并发症也各不相同。因此，发展个体化治疗是多基因疾病进行基因治疗的重要发展方向。基因治疗应该像药物治疗一样，可以相互配伍，进行多基因综合治疗。基因治疗是一个综合的系统生物工程，它包括基因载体的构建、基因的转移、基因在细胞内转运和代谢、基因的核转移、基因的转录和表达调控、基因表达产物的细胞内转运和释放等多个环节，其中的每个环节都会影响基因治疗的效果。

目前，基因治疗作为一种医疗技术还没有达到大规模实施的阶段，但用基因来治疗大多数遗传性疾病可能在21世纪实现。对于个别单基因疾病，渴望在10～20年内取得突破，这将对整个基因治疗领域的研究起到推波助澜的作用。实际上，临床治疗疾病不会用单一方法，往往会根据患者的情况综合采取多种形式进行治疗。因此，从基因治疗的发展程度来说，在相当长的一个时期内它恐怕还需要和常规的医疗技术结合使用，可能会产生更好的治疗效果。

为了有效地治疗多基因疾病，我们期待着两个方面的进展：一是对多基因疾病的发生机制及遗传模式的研究能有所突破，二是能出现更为适合的多基因疾病研究的策略、技术和方法。人类基因组计划，尤其是功能基因组学的研究，不仅限于这些致病基因发现，同时也包括已知和目前未知功能的基因表达调控序列的确定，以及其相互作用规律的阐明。“人类基因组计划”就是要了解人类的整个基因组，发现与了解人类所有的基因，搞清楚这些基因在基因组上的位置。人类已经绘成“人类基因组工作草图”，但与真正精确认识还相距甚远，我们要读懂这本“生命之书”，最终阐释整个基因组，并弄清它们的功能，还有很长的路要走。

综上，我们认为基因疾病是可以治疗的，但是由于目前人类对疾病的认识和治疗技术手段的局限性，治愈基因疾病的目标实现起来仍然任重而道远。

参考文献

Badano JL, Katsanis N. 2002. Beyond Mendel: an evolving view of human genetic disease transmission. Nat Rev Genet, 3(10): 779～789

Escoffre JM, Teissié J, Rols MP. 2010. Gene transfer: how can the biological barriers be overcome? J Membr Biol, 236(1): 61～74

Hirschhorn JN, Daly MJ. 2005. Genome-wide association studies for common diseases and com-

plex traits. Nature Reviews Genetics ,6(2) 95～108

Kere J. 2010. Genetics of complex disorders. Biochem Biophys Res Commun ,396(1):143～146

Kohn DB , Candotti F. 2009. Gene Therapy fulfilling its promise. N Engl J Med ,360 : 518～521

Naldini , LA. 2009. Comeback for gene therapy. Science ,326 : 805～806

Nienhuis AW . 2008. Development of gene therapy for blood disorders. Blood ,111(9) : 4431～4444

Njølstad PR , Hertel JK , Søvik O , et al. 2010. Progress in diabetes genetics. Tidsskr Nor Laegeforen , 130(11):1145～1149

Ott BB. 1995. The human genome project : an overview of ethical issues and public policy concerns. Nurs Outlook ,43(5):228～231

撰稿人:李庆芳

军事医学科学院辐射与辐射医学研究所

影响基因治疗有效性的关键因素

Key Factors for Effective Gene Therapy

基因治疗是指以改变人类遗传物质为基础的生物医学治疗，是通过一定方式将人的正常基因或有治疗作用的DNA序列导入人体靶细胞，去纠正基因缺陷或者发挥治疗作用。因此，基因治疗针对的是疾病的根源——异常的基因本身。基因治疗作为一种新的治疗手段，可以治疗癌症、遗传性疾病、感染性疾病、心血管疾病和自身免疫性疾病等多种疾病。

自1990年美国国立卫生研究院批准第一例临床基因治疗申请以来，基因治疗研究已从单基因遗传病扩展到多基因疾病，如肿瘤、心血管疾病等。基因治疗的策略，概括起来大致分为基因置换、基因修复、基因修饰、基因失活、免疫调节等六种。到目前为止，全球已有500多个基因治疗方案陆续进入临床实验，受试者超过3000人，其中有5个肿瘤基因治疗产品进入临床Ⅲ期。国内已批准转导Ⅸ因子基因的体细胞治疗血友病B，腺病毒介导的p53基因或IL-2基因、HSV-TK用于肿瘤的基因治疗，以及VEGF基因用于肢体动脉闭塞症的特殊临床试验。多数实验研究表明，基因治疗是一种非常有前途的治疗手段。然而目前基因治疗的安全性尚无法确定，靶向性尚需进一步解决，疗效也与预期相去甚远。

外源基因进入靶细胞后可有两种状态，即整合到宿主基因组中（整合型）或游离于宿主基因组之外（游离型）。在整合状态下，如果基因插入宿主基因组的编码区，将导致宿主细胞遗传信息的改变；而不插入编码区则可能激活原癌基因而导致肿瘤的发生，这种致癌作用是长期的，是目前许多短期研究所无法观察的。这两种插入对宿主细胞来说都可能是致命的。同时，如果外源基因游离于宿主基因组之外，则不仅其表达不受宿主基因组的调控，而且其复制也无法调控，这必将使表达产物的量不能受到控制。因此，无论外源基因整合到宿主基因组还是游离于基因组之外都将使基因治疗处于一个两难的境地。此外，两种状态均存在外源基因不能稳定、持续、高效地表达的情况，在动物实验中报道的最长表达时间仅两年，大多为3～6个月，而在临床上也多为暂时性的疗效。

人类在进化过程中已形成了一套复杂有效的自身保护机制，表现为对自体物质的认同和对异己物质的排斥，这对基因也不例外，因此受体细胞总是不断地排斥、削弱外源基因。从免疫学角度来看，宿主也会对基因表达的产物（蛋白质）

和转移基因的载体系统产生中和抗体，中和基因表达产物，影响其临床效果。外来基因不断丢失，其表达产物不断减少，从而使其临床症状不能改善或仅暂时性改善，极大地限制了基因治疗的应用前景。基因治疗中目的基因的表达是影响其治疗效果的关键。外源基因不表达或少量表达将不足以改善临床症状，而超量表达又将导致生理功能的紊乱，故要使基因治疗应用于临床必须控制基因的表达。迄今为止，人类对基因表达调控的认识还是相当肤浅的，从 DNA 转录、翻译到蛋白质产物是一个十分复杂的过程，而我们对这个过程知之甚少。一般来说，基因的表达是受邻近的 DNA 序列（如启动子、增强子等）和外来信号（如生长因子）调控的，而外来信号最终也是由基因决定的，即一个基因的表达总是受众多 DNA 序列的调控。因此，在转入外源基因时，应一并转入相应的调控序列，而这些调控基因又是受更多基因调控的，这样就形成了一个放大效应。尽管这方面的探索较多，但目前的技术水平还是做不到精确调控，即使能做到也涉及伦理学方面的问题。

基因治疗主要有体外和体内两种方式。体外治疗是指含有外源基因的载体在体外导入人体自身或异体细胞，然后经体外扩增后输回体内。虽然这种方案的安全性高，但是除载体系统不易形成规模外，还必需有固定的临床机体。体内治疗的方式是指将目的基因装配于特定的真核细胞表达载体，直接导入体内。但是，这种方式需要充分考虑治疗基因和载体的安全性，且导入人体后，必须能进入靶细胞，有效表达并达到治疗目的。显然，影响基因治疗的另一个关键因素是靶向性的问题，包括组织或细胞靶向性及治疗分子的细胞内或细胞外定位等。纳米颗粒作为基因载体具有一些显著的优点：纳米颗粒能包裹、浓缩、保护核苷酸，使其免遭核酸酶的降解；易于在其表面偶联特异性的靶向分子；核苷酸缓慢释放，有效地延长作用时间，并维持有效的药物浓度，提高转染效率和转染产物的生物利用度；代谢产物少，副作用小，无免疫排斥反应等。半乳糖基化壳聚糖（GC）与质粒 pEGFPN1 混合制备成纳米微囊，将 1mg 质粒的纳米微囊经肝动脉和门静脉给药，结果表明其在犬体内有肝靶向性。腺病毒利用病毒自身感染宿主细胞的特点，能够简便有效地将目的基因导入靶细胞，并使其有效表达。通过对纤维蛋白、五邻体蛋白和六邻体蛋白进行改造，插入能够与肿瘤细胞或特定细胞表面特异性受体结合的配体，能够明显提高腺病毒载体的靶向性，进而提高疗效。此外，还可以通过对病毒外壳蛋白遗传性修饰等方式改变病毒的靶向性。采用组织特异性启动子的策略也可以提高目的基因的靶向性，如在肿瘤的基因治疗中采用肿瘤特异性的启动子，再以腺病毒或逆转录病毒的形式导入细胞因子、抗血管生成因子等。基因的肿瘤治疗中，还要使大量表达的目的基因分泌到细胞外，以影响肿瘤的生长或抗肿瘤血管的生成。

总之，基因治疗给人们治疗某些目前尚未解决的疾病带来了希望，其蕴藏的

巨大潜力毋庸置疑。但其在基础研究领域存在的许多关键性问题，尤其是基因治疗的安全性问题、基因及其表达产物的异己排斥、基因表达调控、基因导入系统及寻找合适的治疗基因等方面存在的问题，使我们认识到，对基因治疗所产生的过高期望是不现实的。上述目前尚未解决的关键性问题对基因治疗的研究提出了严峻的挑战，只有在上述基础性研究上取得突破性进展，才能使基因治疗真正走向临床。

参考文献

卢大儒，邱信芳，薛京伦．1995．基因转移工程进展．生物工程进展，2：5

卢一凡，邓继先，肖成祖，等．1997．提高转基因动物基因表达水平的途径．国外医学·遗传学分册，6：292

王军志，丁锡申．1997．国外基因治疗临床研究动向及市场展望．生物工程进展，3：56

徐铿，陈诗书．1994．基因转移所用的逆转录病毒载体系统．生命的化学，3：3

Fox MS, Littlefield JW. 1971. Reservations concerning gene therapy. Science, 173 (993): 195

Jakubczak J, Ryan P, GorzigliaM, et al. 2003. An oncolytic adenovirus selective for retinoblastoma tumor suppressor protein pathway—defective tumors: dependence on E1A, the E2F-1 promoter, and viral replication for selectivity and efficacy. Cancer Res, 63: 1490

Krasnykh VN, Douglas JT, van Beuschem VW. 2000. Genetic targeting of adenoviral vectors. Mol Ther, 1: 391

Lee J, Wang A, Hu Q, et al. 2006. Adenovirus-mediated interferon-beta gene transfer inhibits angiogenesis in and progression of orthotopic tumors of human prostate cancer cells in nude mice. Int J Oncol, 29 (6): 1405～1412

Li X, Liu YH, Zhang YP, et al. 2007. Fas ligand delivery by a prostate-restricted replicative adenovirus enhances safety and antitumor efficacy. Clin Cancer Res, 13 (18 Pt 1): 5463～5473

Wu H, Han T, Belousova N, et al. 2005. Identification of sites in adenovirus hexon for foreign pep tide incorporation. Virol, 79: 3382

撰稿人：杨月峰

军事医学科学院辐射与辐射医学研究所

细胞治疗的临床效果

Clinical Effect of Cell Therapy

细胞治疗是应用自体、异体或异种细胞，直接或经体外加工处理后回输或植入患者体内从而达到治疗目的一种治疗手段。造血干细胞移植是细胞治疗最早建立的一种形式，1958 年 Kurnick 等首次对接受高剂量放疗的畸胎瘤和肾癌患者进行自体骨髓移植促进造血恢复。随着对 HLA 配型认识的提高、更有效抗生素的应用及常规输注血小板的研究深入，1968 年 Gatti 等首次采用异体骨髓移植成功治疗 1 例严重联合免疫缺陷患者，开启了人类造血干细胞移植的时代。最初，干细胞主要来源于同胞供者；随着国际合作及无关供者骨髓库的建立，1986 年开始进行 HLA 相合的无关供者移植；此后随着细胞生物学发展及细胞刺激因子的应用，1989 年开始进行脐带血及外周血干细胞移植。造血干细胞移植经过 50 多年的发展，目前已广泛应用于非恶性和恶性血液病、某些实体瘤及重症自身免疫性疾病的治疗，取得了良好的疗效。其中 HLA 相合同胞供者造血干细胞移植治疗重型再生障碍性贫血患者的长期生存率达 75% ～90% ；慢性粒细胞白血病患者达 70% ～80% ；急性髓性白血病患者达 50% ～60% ；首次缓解的急性淋巴细胞白血病患者达 48% 。

虽然造血干细胞移植获得了确切的临床疗效，但目前仍然存在许多亟需解决的难题，其中最重要的难题是移植物抗宿主病（GVHD）及肿瘤移植后复发。至今为止，GVHD 仍是移植相关死亡的主要原因，是移植的首要障碍。特别是急性 GVHD。虽然采用 T 细胞去除的方法能有效控制 GVHD，但治疗的同时会引起诸如增加移植排斥及白血病复发风险等严重的并发症。目前主要采用特异性药物和非选择性去 T 细胞的方法，重点是诱导特异性免疫耐受，防止在免疫重建的同时发生急性 GVHD。在 GVHD 确实发生的情况下，给予靶向性单抗，例如达克珠单抗、伊诺莫单抗、英夫利昔单抗等，既可阻断宿主的免疫反应，也能防止组织损伤。此外，间充质干细胞（MSC）由于其能够抑制异源性 T 细胞的增殖和细胞因子分泌，已被应用于难治性 GVHD 治疗，并取得了一定疗效。由于目前仍缺乏预测急性 GVHD 有效的临床指标，而内皮细胞是 GVHD 的主要靶细胞，因此内皮细胞活性的生化指标及调节其活性的药物将是未来研究的重点。此外，随着对 $CD4^{+}CD25^{+}$ 调节 T 细胞认识的逐渐提高，针对其研发的药物在 GVHD 治疗中也将发挥重要作用。移植后肿瘤复发是造血干细胞移植治疗失败

的最主要原因，因此许多研究者对于预防移植后肿瘤复发做了大量研究，通过早期减停免疫抑制剂方法，从而最大限度地发挥移植物抗白血病作用（GVL），疗效不佳。但通过监测肿瘤微小残留病灶，结合预防或治疗性地进行供者淋巴细胞输注（DLI），获得良好的临床疗效。特别是对于慢性粒细胞白血病慢性期移植后复发的患者，再次完全缓解率达 80％。此外，免疫细胞治疗也是目前预防肿瘤复发的重要治疗手段。其中包括 CIK 细胞及 DC 细胞。CIK 细胞是由多种细胞因子在体外诱导培养淋巴细胞及单个核系细胞而获得的免疫细胞，具有 T 淋巴细胞的杀瘤活性和 NK 细胞活性。而 DC 细胞是人体内最强的抗原提呈细胞，能捕获、提呈肿瘤抗原并激活初始型的 T 淋巴细胞及增强 CIK 细胞抗瘤活性，引发一系列的肿瘤抗原特异性的免疫应答，是免疫反应的激发者。因此，应用于手术或放、化疗以及自体骨髓移植后的辅助治疗，取得了一定疗效。但是如何进一步提高疗效仍是临床要解决的问题。细胞的制备方案、具体注射剂量及途径、与其他佐剂联合应用等问题是未来研究的重点。对于造血干细胞移植来说，未来方向还需着重于解决如何在降低 GVHD 的同时提高 GVL 效应及扩大移植物来源，从而扩大移植范围且提高移植的临床疗效。

近年来随着细胞生物学尤其是干细胞生物学的飞速发展，细胞治疗在基础研究领域取得了很大的进展，已开始拓展应用到心血管系统疾病、神经系统疾病、肌肉骨骼相关疾病、糖尿病等多种疾病的临床试验中，并取得了令人振奋的初步研究成果。例如缺血性心脏病，通过将细胞移植到心肌梗死区域，为受损心肌的再生提供细胞来源和细胞因子，从而达到促进损伤心肌修复、改善心脏功能的目的。Schachinger 等报道了 204 例心肌梗死患者接受骨髓单个核细胞（BMNC）治疗后发现，移植组患者治疗后 1 年内不良事件（死亡、心肌梗死再发、心脏重构）发生率明显低于安慰剂对照组，表明 BMNC 治疗心肌梗死是有效的。Fernandez 等报道了应用自体 BMSC 经脾动脉移植治疗糖尿病的初步临床研究结果，23 例 1 型糖尿病患者干细胞移植治疗后 90 天血糖水平平均降低 9.7％，C 肽显著增加 55％，外源性胰岛素用量减少 17％；16 例 2 型糖尿病患者干细胞移植治疗后 90 天血糖水平平均降低 29％，C 肽增加 26％，体内胰岛素水平增加 19％，84％的患者在 90 天观察期内可不用降糖药物或注射胰岛素治疗。以上研究报道初步提示了细胞移植治疗临床应用的可行性，但离广泛的临床应用仍有一定的距离。筛选移植的最佳细胞类型、细胞数量、移植时间、移植次数和频率，规范移植细胞的体外培养流程，优化细胞移植途径，研究移植后细胞在体内的存活时间及阐明相应的作用机制等是需要进一步解决的问题。

我们相信，随着基础研究领域的不断进展，细胞治疗必将广泛应用于临床治疗多种疾病，最终将会成为一种造福亿万患者的新疗法。

参 考 文 献

Collins SD, Baffour R, Waksman R. 2007. Cell therapy in myocardial infarction. Cardiovasc Revasc Med, 8 (1): 43～51

Fernandez Vina R, Andrin O, Saslavsky J, et al. 2006. Increase of "c" peptide level in type 1 diabetics patients after direct pancreas implant by endovascular way of autologous adult mononuclear CD34＋CD38(-) cells (Teceldiab 2 study). 4th International Society for Stem Cell Research Annual Meeting. Toronto

Fernandez Vina R, Saslavsky J, Andrin O, et al. 2006. First word reported data from Argentina of implant and cellular therapy with autologous adult stem cells in type 2 diabetic patients (Teceldiar study 1). 4th International Society for Stem Cell Research Annual Meeting. Toronto

Jacobsohn DA, Hallick J, Anders V, et al. 2003. Infliximab for steroid-refractory acute GVHD: a case series. Am J Hematol, 74: 119～124

Jennifer T, A. John B. 2009. Hematopoietic stem cell transplantation in clinical practice. Churchill Livingstone: Elsevier

Larmonier N, Fraszczak J, Lakomy D, et al. 2010. Killer dendritic cells and their potential for cancer immunotherapy. Cancer Immunol Immunother, 59 (1): 1～11

Porter DL, Collins RH Jr, Shpilberg O, et al. 1999. Long-term follow-up of patients who achieved complete remission after donor leukocyte infusions. Biol Blood Marrow Transplant, 5(4): 253～261

Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, et al. 2006. Intracoronary bone marrow derived progenitor cells in acute myocardial infarction. N Engl J Med, 355 (12): 1210～1221

撰稿人：扈江伟　陈　虎

中国人民解放军 307 医院

细胞可以作为常规治疗制剂吗

Be Careful to Use Cellular Therapy

细胞治疗是指将自体、同种异体或异种细胞，经过或不经过体外处理，回输入人体组织以达到治疗疾病的目的。细胞治疗种类繁多，方案各异，具有多种不同类型，包括自体或异体干细胞（如造血干细胞、间充质干细胞等）移植，成熟的功能细胞（如血细胞、免疫细胞、肝细胞、软骨细胞等）移植，回输体外基因修饰过的细胞以治疗某些遗传性疾病（如 X-连锁性肾上腺脑白质营养不良症），异种细胞移植（如利用可产生胰岛素的猪细胞治疗糖尿病）等。近年来，细胞治疗一直是生命科学领域的热点之一，随着细胞生物学及分子生物学的迅速发展，细胞治疗的基础研究及临床试验取得了明显进展，相关研究成果多次被《科学》、《自然》等国际顶级杂志报道。

应该说，血细胞输注及造血干细胞移植是最主要、最成功的细胞治疗，已得到充分肯定。近年来，细胞治疗的应用领域不断扩展，发展到治疗心血管疾病、神经系统疾病、骨骼肌肉系统疾病、糖尿病及肿瘤等，为人类攻克一系列难治性疾病带来了巨大希望。

但不得不承认，目前多数细胞治疗还处于探索阶段，确切的作用机制尚未完全搞清楚。而且细胞治疗也是把“双刃剑”，其临床应用的安全性、有效性及医学伦理方面仍然是目前争论的焦点及难题。因此，无论是患者还是医疗单位，在选择细胞治疗时一定要慎重！要严格掌握细胞治疗的适应证，不能盲目地把细胞当做常规治疗制剂，甚至是“包治百病的万能药”！

就安全性而言，与一般化学制剂不同，细胞的制备技术更具有多样性、复杂性和特殊性的特点，难以大规模生产、质检及储备；从供体的选择到细胞的采集、分离、培养、储存以至最终细胞的回输，都对其安全性提出了更大的考验。而且细胞治疗的最终制品不是某一种单一物质，而是一类具有特定生物学效应的活细胞（如造血干细胞、间充质干细胞、自然杀伤细胞、树突细胞等），甚至是经过体外激活或基因修饰等处理的活细胞，植入体内后不仅可以发挥治疗作用，同时可能与机体多种组织细胞发生复杂的联系，如发生过敏反应、毒性反应等副作用。例如解放军 307 医院造血干细胞移植科率先在国际上开展了临床随机对照试验，观察间充质干细胞与异基因造血干细胞共移植预防移植物抗宿主病的作用，预防作用明显，但同时也首次发现间充质干细胞输注可能会增加恶性血液病

的复发率，为间充质干细胞的滥用敲响了警钟。另外，某些细胞治疗（如异基因造血干细胞移植等）由于要求严格的组织配型，甚至只能针对某个特定的患者，也就是说必须从免疫学方面提供细胞治疗的安全性依据。此外，干细胞在体内可长期存活，因此必须确定此类细胞治疗的致癌性及长期安全性。以治疗缺血性心脏病为例，有报道指出，应用胚胎干细胞植入心脏可能会导致畸胎瘤；而局部注射骨骼肌源性干细胞，有形成异位兴奋灶诱发心律失常的危险；尽管目前骨髓细胞移植治疗缺血性心脏病取得了可喜的进展，但 Yoon 等观察到在大鼠冠脉内注射骨髓细胞可引起心肌钙化。

就有效性而言，必须承认细胞治疗作为一种新兴的治疗手段，在基础研究、临床试验及临床应用方面均取得了确实效果和重大进展，为解决许多人类健康难题提供了更有效、更有希望的治疗平台，应用前景非常广阔。但我们也应该看到，目前多数细胞治疗仍处于探索及实验阶段，已经成熟的疗效确实的细胞治疗方法还不多。恶性血液病、再生障碍性贫血及一些自身免疫性疾病和遗传性疾病，可以通过自体或同种异体造血干细胞移植进行有效治疗；一些组织特异性干细胞移植，如皮肤和角膜组织中提取的干细胞，可用于这些组织的再生修复。而对于多数疾病而言，仍需要确定哪类细胞治疗能够最有效地修复受损组织及治愈疾病，以及如何将目的细胞植入到体内正确的位置。细胞治疗的有效性评价体系复杂而特殊，包括细胞表型、生物学效应、动物试验及临床试验等诸多环节。但目前确实存在着对细胞治疗的不实宣传及擅自开展的现象，容易对患者产生误导。一些研究在设计、施行及统计等过程中不够严谨、科学，因此相应疗效的统计结果不能令人信服；甚至少数机构、少数人故意夸大疗效、隐瞒副作用；还有通过心理暗示等手段让患者自认为相应的细胞治疗明显有效，而事实上有些效果与细胞治疗无关。例如，一些利用干细胞治疗缺血性心脏病的临床试验研究显示了非常满意的疗效，但是分析这些研究就会发现多数存在着病例数少、随访时间短、缺乏安慰剂对照、细胞治疗仅作为冠状动脉介入治疗的辅助治疗等局限性，因此不能客观地评价细胞治疗的疗效。再举个例子，有人采用干细胞治疗脊髓损伤，并表示确实能改善一两个感觉平面，然而有神经外科专家表示质疑，神经系统非常复杂，症状好转并不能代表就是干细胞在其中起到了关键性的作用，可能是某些营养神经的药物、康复治疗或是血供的改变也同样使症状有所改善。因此，一些细胞治疗的疗效评价体系尚需完善。

此外，细胞治疗特别是干细胞治疗技术的临床应用还涉及重大伦理问题，应遵循科学性原则、不伤害原则、知情同意原则、对患者有利原则、尊重原则。临床试验及临床应用治疗前，患者及家属应享有充分的知情权，应当充分告知治疗目的、治疗风险、治疗后注意事项、可能发生的并发症及预防措施等，并签署知情同意书。

美国军方2008年购买2万剂成体间充质干细胞产品储备，拟用于治疗辐射引起的胃肠损伤及战时骨、软骨、脊髓损伤等疾病。但目前还是需要全社会冷静地思考和探索细胞治疗技术的基本理论和伦理问题，需要更大量的基础研究，需要更严格的临床试验和长期随访观察。但我们有理由相信，随着科技水平的不断提高，细胞治疗会被越来越多的人所认识，相关技术和实施方案会越来越优化，细胞治疗必然会成为解决一系列人类健康难题的重要方法。

参考文献

Cartier N, Hacein-Bey-Abina S, Bartholomae CC, et al. 2009. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. Science, 326: 818～823

Christensen D. 2001. Mending a broken heart. Science News, 159: 30

Dove A. 2002. Cell-based therapies go live. Nat Biotechnol, 20: 339～343

H David Humes. 2003. Cell therapy: leveraging nature's therapeutic potential. J Am Soc Nephrol, 14: 2211～2213

Min JY, Yang Y, Converso KL, et al. 2002. Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in post infarcted rats. J Appl Physiol, 92 (1): 288

Ning H, Wang J, Chen H, et al. 2008. The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study. Leukemia, 22: 593～599

Yoon YS, Park JS, Tkebuchava T, et al. 2004. Unexpected severe calcification after transplantation of bone marrow cells in acute myocardial infarction. Circulation, 109: 3154～3157

撰稿人：王　军　陈　虎
中国人民解放军307医院

肿瘤干细胞与多药耐药

Cancer Stem Cell and Multi Drug Resistance

肿瘤作为困扰人类的顽症之一，具有发病率高、病死率高、复发率高及治疗困难的特点。自20世纪70年代以来，虽然手术、化疗、放疗技术均有很大进展，但肿瘤患者生存率的提高仍然有限，肿瘤的复发与多药耐药是治疗失败的主要原因，也是人们必须设法解决的难题。

传统的肿瘤治疗策略基于克隆演变模型。该模型认为，一部分细胞由于累积突变导致细胞的生长、增殖或程序性死亡失控，从而生成肿瘤。在肿瘤细胞的群体中，单个肿瘤细胞不断发生并累积突变，其中具有选择优势的突变细胞将在肿瘤细胞群体中占据优势。此模型中，肿瘤可以是均一的细胞，也可以是异质的细胞团体，没有层次结构，所有细胞都具有相似的引起肿瘤发生、维持肿瘤生长的能力。因此，在肿瘤的治疗中，对所有肿瘤细胞采用的治疗策略要求尽可能多地清除肿瘤细胞。一旦不能彻底清除，剩余的肿瘤细胞将引起肿瘤复发及耐药。

但是，在肿瘤实际治疗中，除了少部分早期诊断的病例，想完全、彻底地清除肿瘤细胞经常是不现实的。近年来，另外一个肿瘤发生及生长的理论模型即肿瘤干细胞（cancer stem cell，CSC）假说为解决这个难题提供了新的思路。该假说认为，只有很小一部分细胞即肿瘤干细胞具有引起肿瘤发生、维持肿瘤生长、保持肿瘤异质性的能力。如果治疗中忽略了这部分细胞，即使其他大部分肿瘤细胞都被消灭，肿瘤仍然会面临着复发的可能；反之，如果能消除这部分细胞，则有可能治愈肿瘤。因此，深入了解肿瘤干细胞的生物学特性，发展出针对肿瘤干细胞的特殊治疗方法，对于肿瘤的治愈具有重大的临床意义。

肿瘤干细胞假说最早的实验证据来自白血病。1997年Bonnet等首次从人类急性髓性白血病患者体内分离出了表型为$CD34^{+}CD38^{-}$的白血病干细胞，第一次证实了肿瘤干细胞的存在。研究发现，接种很少数量的$CD34^{+}CD38^{-}$细胞到NOD/SCID小鼠体内即可形成肿瘤，而接种其他细胞（数量更多）则不能形成肿瘤，表明这部分拥有$CD34^{+}CD38^{-}$细胞表面抗原标志的细胞可能是肿瘤干细胞。它们的细胞表面抗原标志与正常的造血干细胞类似，也暗示了白血病中的肿瘤干细胞可能是来源于正常的造血干细胞。2002年，Clarke的研究小组利用流式细胞仪首次从乳腺癌中分离出肿瘤干细胞。2003年Al-Hajj等通过特异性的细胞表面标志$Lin^{-}ESA^{+}CD44^{+}CD24^{-/low}$分离纯化出乳腺癌干细胞，这种干细胞

只占乳腺癌细胞的 2%，但只需要 200 个左右细胞就可在小鼠乳腺中形成肿瘤。此后，研究人员又用不同的细胞表面分选标志分子分别从脑神经胶质瘤、肉瘤、结肠癌、头颈癌、肝癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌中分离出肿瘤干细胞，这些研究进一步支持了肿瘤干细胞假说，也为开拓新一代肿瘤治疗方案提供了依据。

肿瘤干细胞在肿瘤的多药耐药中起着重要的作用。目前，对肿瘤干细胞多药耐药发生机制的研究和逆转耐药药物的研发是一项重要的课题。肿瘤干细胞主要通过以下机制引发多药耐药：①肿瘤干细胞处于 G_0 期。肿瘤干细胞多处于细胞生长周期的 G_0 期，增殖不活跃，对临床上常用的周期时相特异性化疗药物不敏感。这些药物只能杀死处于有丝分裂期增殖活跃的肿瘤细胞，而对肿瘤干细胞的杀伤作用并不大。停药后肿瘤干细胞一旦受到适当刺激便可重新进入细胞分裂周期，继续分裂增殖生成新的肿瘤细胞，造成肿瘤复发。②ABC 转运蛋白的药泵作用。ABC 转运蛋白是一类跨膜蛋白，在体内分布广泛，可转运肽类、内源性脂质、核苷酸、代谢性药物等。其中 ABCG2 是肿瘤干细胞主要的 ABC 转运蛋白，在不同来源的肿瘤干细胞中均呈高表达，其功能被认为是参与肿瘤细胞的多药耐药性。③肿瘤干细胞的微环境与肿瘤多药耐药。肿瘤干细胞的微环境可能也参与了肿瘤的多药耐药。30 年前，研究人员研究了造血干细胞与骨髓周围微环境的关系，指出骨髓造血微环境通过细胞-细胞及细胞-基质之间的相互作用对造血干细胞的生存及功能产生重要作用。④抑制细胞程序性死亡。诱导细胞程序性死亡是众多化疗药物杀伤肿瘤细胞的共同机制。肿瘤干细胞高度表达 Bcl-2 基因家族的 Bcl-2、Bcl-x 和 Bcl-W 等抗程序性死亡基因，使得通过诱导肿瘤细胞程序性死亡达到治疗目的的化疗药物无法发挥作用，导致肿瘤耐药性的产生。

针对肿瘤干细胞的多药耐药发生机制，为了克服肿瘤干细胞的多药耐药，人们在以下多个方面进行了有益的探索：①ABC 转运蛋白抑制剂。即通过 ABC 转运蛋白抑制剂联合化疗药物克服肿瘤干细胞的耐药性，消灭大多数肿瘤干细胞。②诱导分化。干细胞的自我更新、增殖、分化主要依赖于其生存的特殊微环境。肿瘤干细胞可能存活在异常的微环境中，打破这种异常的微环境就能减弱肿瘤干细胞的自我更新，从而抑制肿瘤的生长。③靶向治疗。肿瘤干细胞胞膜上存有特异性细胞因子，将药物以纳米材料、共价键结合方式特异性地定位于靶细胞，从而特异性地针对肿瘤干细胞进行治疗。对肿瘤干细胞的多药耐药发生机制的研究有助于人们设计特异的清除肿瘤干细胞的方法，为彻底“治愈”肿瘤提供了可能。

对肿瘤干细胞的研究已成为当前肿瘤研究的热点，尽管目前肿瘤干细胞研究已取得很大的进展，但仍然存在不少问题，例如：①肿瘤干细胞假说不适用于所有肿瘤；②缺乏一个普遍适用的表面标记；③动物评价模型可能低估肿瘤干细胞的数量。后续的研究应该在解决上述问题的基础上，找到针对性的清除肿瘤干细

胞的办法。

随着对肿瘤干细胞研究的深入，以及肿瘤干细胞假说的完善，相信在不久的将来，人们终究会探明肿瘤干细胞的生物学特性，为治愈肿瘤开辟一条光明的道路。

参考文献

Al-Hajj M, Wicha MS, Clarke MF, et al. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci USA, 100: 3983～3988

Bonnet D, Dick JE. 1997. Human acute myeloid leukemia is organized a hierarchy that originates from a primitive hematopoietie cell. Nat Med, 3 (7): 730～737

Clarke MF, Morrison SJ, Wicha MS, et al. 2002. Isolation and use of solid tumor stem cells. United States Patent Application, 2002119565

Kelly PN, Dakic A, Adams JM, et al. 2007. Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. Science, 317: 337

Mackillop WJ, Ciampi A, Till JE, et al. 1983. A stem cell model of human tumor growth, implications for tumor cell clonogenic assays. J Natl Cancer Inst, 70: 9～16

Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, et al. 2009. Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. Cell, 138 (5): 822～829

撰稿人：路国秋　陈　虎
中国人民解放军 307 医院

核酸药物如何有效给药

How to Deliver Nucleic Acid Drugs Effectively

核酸药物指人工设计并合成的一类短片段脱氧核糖核酸（DNA）或核糖核酸（RNA），它们能与靶标信使 RNA（mRNA）完全或部分互补，抑制疾病相关基因的表达而起到治疗疾病的作用，主要包括反义寡核苷酸、核酶、小干扰 RNA（siRNA）、小核酸（miRNA）等（图 1）；此外，作用于特定蛋白质的适配子（aptamer）和发挥免疫刺激作用的 CpG 寡核苷酸也归入其中。与传统药物相比，核酸药物不仅作用效率高、特异性好，而且作用机制明确、便于合理设计，因此得到国际上各大制药公司的高度重视，纷纷投入巨资进行此类药物的开发。经过 30 多年的发展，核酸药物已从实验室走向市场，目前已有两种局部给药的核酸药物（Vitravene™ 和 Macugen™）批准上市，另有 40 余种正在进行各期临床试验，治疗的疾病涵盖癌症、感染性疾病、心血管系统疾病、免疫性疾病等。

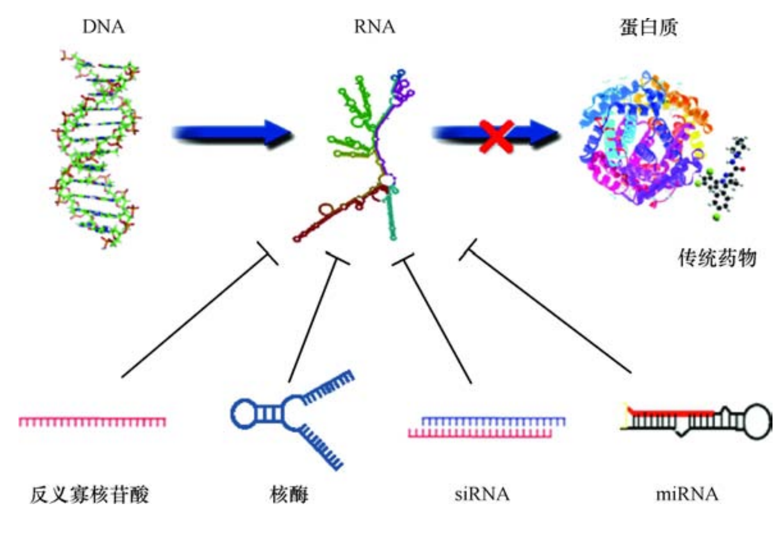


图 1　核酸药物种类

然而，尽管核酸药物从理论上讲有许多优点，但实际上远非人们最初预想的那样简单。在全身用药时，这类药物的特异性、稳定性、穿透靶细胞的能力、给

药途径等方面依然存在诸多问题，还需要进一步的研究来解决。核酸药物在使用时必须具备足够的稳定性，并且只有到达相应的靶细胞内才能发挥作用，因此如何提高核酸药物在体内的稳定性及如何更有效地给药是目前这类药物应用方面的两大难题。

对于第一个难题，由于核酸药物属于内源性物质，未经修饰的寡核苷酸在体内很快被核酸酶所降解，使其未到达作用靶点前就失效了，因此科学家们寻找到化学修饰或结构改造的方法来提高它们抵抗核酸酶的能力。针对核酸分子的化学修饰主要有三个部位，即磷酸骨架、糖环（尤其是核糖的 2′位）和碱基，核酸药物也从第一代发展到第三代。目前进入临床试验阶段的主要为第一代硫代修饰（PS）、第二代混合骨架（MBO）及第三代中吗啉代修饰（PMO）的核酸药物。通过这些化学修饰可以有效改善核酸药物在血清中的稳定性、生物利用度及药代动力学等方面的缺陷。

而对于后一个难题，除了对核酸分子自身进行结构修饰和改造外，寻找合适的药物递送系统以提高细胞摄取效率和靶向性是目前解决该难题的思路。本质上说，核酸递送技术包括各种物理和化学方法、病毒和非病毒载体系统及裸核酸的直接吸收等，都有各自优缺点，并只在一定条件下适用。一般来说，物理和化学给药途径如显微注射、电击或磷酸钙共沉淀等虽然高效，但因其对靶细胞的伤害太大而缺少体内应用的潜在价值，而病毒载体因其安全性不好使得人们越来越多地关注安全性较高的非病毒载体递送系统。

目前非病毒载体递送系统主要利用脂质体包裹、纳米粒或微球制剂、各类高聚物载体，以及在核酸分子上连接特异性受体的配体或细胞膜表面活性分子等方式来提高靶细胞对核酸药物的摄取，但脂质体和阳离子多聚物等方法由于较低的转染效率和高细胞毒性限制了其在体内的应用。近年来，又相继发现一些具有细胞膜穿透能力的多肽（穿膜肽），可以将与之偶联的核酸药物携带进入靶细胞，起到载体或转运的作用，但这些研究多数局限在细胞水平，对动物体内药物递送方法的研究和应用还很有限，更未应用于临床。然而有意思的是，目前很多动物模型和临床试验都是直接使用裸露的核酸药物，而不借助任何递送系统的帮助，也都达到了一定的治疗效果，提示可能活体细胞比培养细胞对核酸药物的摄取更为有效，也许两者转运机制不同，还需进一步的研究。

此外，选取合适的给药途径和剂型也能有效提高作用部位核酸药物的浓度和治疗效果。现行的核酸药物可以通过多种途径给药，包括局部注射、雾化吸入、滴鼻、静脉和腹腔注射等，均取得较好的效果。其中病灶周围的局部用药，可提高局部药物浓度从而增加特异性、减少给药剂量，并降低毒性。而由于存在首过效应，口服途径给药的生物利用度高低一直存在着争论，但有研究表明，混合骨架修饰可以增强寡核苷酸在消化道中的稳定性，提高口服给药的生物利用度。随

着制剂技术和化学修饰技术的日益发展，更有效的核酸药物给药方式与剂型还将不断出现。

综上所述，核酸药物今后研究的重点仍是寻找简便、高效、靶向性强的递送方法和开发有效便捷并可全身使用的药物制剂。尽管针对核酸药物各类给药系统的研究目前取得了一定的突破和进展，但要使寡核苷酸分子成功应用于生物体，仍有一些关键性的问题需要解决。相信随着这些问题的突破，核酸药物的临床应用将更加广泛，对疾病的治疗也将是一场新的革命。

参考文献

Agrawal S, Zhang X, Lu Z, et al. 1995. Absorption, tissue distribution and in vivo stability in rats of a hybrid antisense oligonucleotide following oral administration. Biochem Pharmacol, 50(4): 571～576

Bartel DP. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell, 116 (2): 281～297

Corey DR. 2007. Chemical modification: the key to clinical application of RNA interference? J Clin Invest, 117 (12): 3615～3622

Garcia-Chaumont C, Seksek O, Grzybowska J, et al. 2000. Delivery systems for antisense oligonucleotides. Pharmacol Ther, 87 (2～3): 255～277

Ireson CR, Kelland LR. 2006. Discovery and development of anticancer aptamers. Mol Cancer Ther, 5 (12): 2957～2962

Juliano R, Alam MR, Dixit V, et al. 2008. Mechanisms and strategies for effective delivery of antisense and siRNA oligonucleotides. Nucleic Acids Res, 36 (12): 4158～4171

Kurreck J. 2003. Antisense technologies improvement through novel chemical modifications. Eur J Biochem, 270 (8): 1628～1644

Rayburn ER, Zhang R. 2008. Antisense, RNAi, and gene silencing strategies for therapy: Mission possible or impossible? Drug Discov Today, 13 (11～12): 513～521

Wang H, Rayburn E, Zhang R. 2005. Synthetic oligodeoxynucleotides containing deoxycytidyl-deoxyguanosine dinucleotides (CpG ODNs) and modified analogs as novel anticancer therapeutics. Curr Pharm Des, 11 (22): 2889～2907

Yazaki T, Ahmad S, Chahlavi A, et al. 1996. Treatment of glioblastoma U-87 by systemic administration of an antisense protein kinase C-alpha phosphorothioate oligodeoxynucleotide. Mol Pharmacol, 50 (2): 236～242

撰稿人：王升启　鲁丹丹

军事医学科学院放射与辐射医学研究所

生物药物的质量控制

Quality Control of Biopharmaceuticals

1953 年 Watson 和 Crick 提出的脱氧核糖核酸（DNA）双螺旋结构模型，阐明了生物有机体遗传物质的基本结构，是分子生物学和现代生物技术发展的里程碑。以此为基础，在随后几十年陆续出现了基因操作技术、转基因动植物研究、基因治疗技术、蛋白质工程技术、RNA 干扰技术等，这些新发现和新突破为现代生物技术的发展和应用奠定了基础。1982 年，FDA 批准了第一个基因重组生物药物胰岛素 Humulin，揭开了生物制药的序幕。生物药物按用途、制备原料及生产方法一般可分为两类。第一类为预防用制品，即疫苗类制品，包括细菌性疫苗、病毒性疫苗及类毒素疫苗等；第二类为治疗性用品，包括重组生物技术药物（包括重组细胞因子、融合蛋白、单克隆抗体等）、抗血清类制品和血液制剂。我国生物药物起步较晚，但在国家产业政策支持下发展迅速，自 1992 年中国第一个基因工程产品干扰素 α1b 上市以来，已有 30 余种生物药物上市。生物药物作为 21 世纪的重要支柱产业之一，显示了前所未有的生命力。

药品的质量源于设计，而非靠单纯的产品检测即可保证，生物药物也不例外。广义的生物药物质量控制包括生产过程控制、终产品质量控制等环节。因此，不仅要对最终产品的质量实施有效的控制，而且要特别重视对生产工艺的全过程进行质量控制，其中包括对每个生产步骤的验证，遵循药品生产质量管理规范（GMP），以及质量保证（QA）和质量检定（QC）部门对生产全过程进行严格的管理以保证产品质量。生物药物的质量控制要根据不同产品的生物学或理化特性及生产工艺特点，研究建立相应的质量控制检测方法和检测用标准物质。质量控制检测方法和相关标准物质又是生物药物质量标准的两个重要技术支撑点，通常终产品只有在经过检测并符合质量标准后才能放行。同时，完善的质量标准也是促进生物药物研发和产业化进程承上启下的桥梁与纽带，在生物药物的开发和注册程序（图 1）中起着重要的作用，只有采用符合一定质控标准的产品才能在非临床安全评价、临床试验等研究中获得可靠的数据。经过研究建立的生物药物的质量标准及质量控制体系在保证药物的安全、有效和质量监控方面发挥着重要的作用。

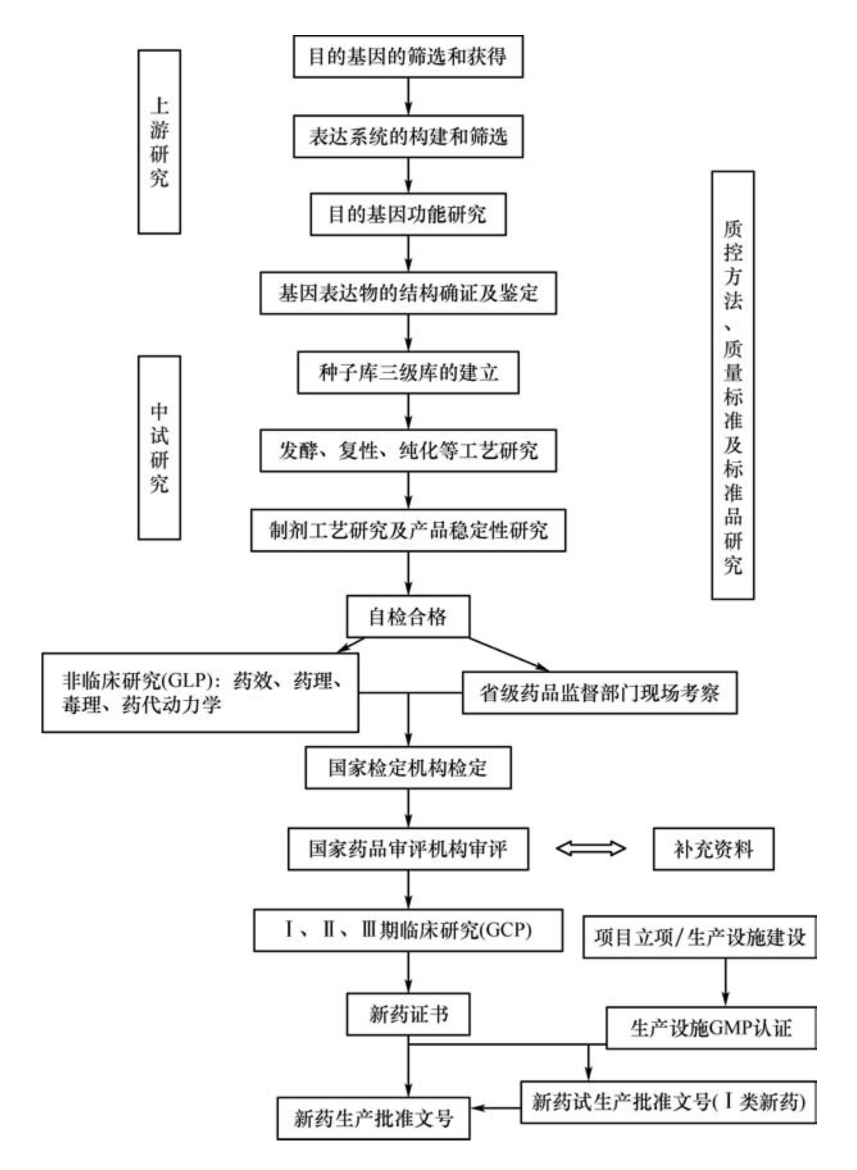


图 1　我国生物药物开发和注册程序

生物药物的质量控制体系主要包括：

生物药物生产的 GMP 要求。这是从管理层面保证质量，即生产单位必须在立项、建厂和生产时，严格按照 GMP 对药品生产的有关要求，在人员、硬件和软件等方面全面计划和保障，既保证拥有训练有素的生产、检验和管理人员，并具备合适的厂房、设施及设备，合格的原辅料及包装材料，以及采用经过验证符合要求的生产工艺方法，建立可靠的质量控制体系和完善的售后服务等，以最大

限度地降低生产过程中出现的偏差对产品质量的风险，保证生物药物的安全和有效。

生物药物检测方法的建立与验证。由于生物药物具有分子质量大、结构复杂、对稳定性要求较高及生物学测定波动较大的特点，应从专属性、准确性、精密性、线性、测定范围、检测限度、定量限度、特异性和耐用性（或可靠性）等几个指标对检测方法进行验证。近年来基于新型仪器设备的新检测方法，在应用前均经过上述环节的方法学验证，比如质谱仪用于复杂糖蛋白的精确分子质量测定和结构解析，定量 PCR 仪用于 DNA 残留量的测定，流式细胞仪用于病毒感染滴度的测定等。

生物药物标准物质的研究。生物标准物质系指用于生物药物效价、活性或含量测定，或用于其特性鉴别、检查的生物标准品、生物参考品或对照品。根据使用目的不同，生物标准物质分为三级：国际、国家和工作标准物质。WHO 负责建立国际标准品和其他生化物质的国际参考品，世界卫生组织的成员国一致承认并使用 WHO 的标准品。NIBSC（英国国家生物标准与检定所）是 WHO 的生化标准品国际实验室，并负责在世界范围内生产和分发生物药物的国际标准制剂。国家标准物质的建立，首先要按照 WHO 标准品制备要求对原料进行全面检定，并且以 NIBSC 的国际标准品为标准进行标定，按照相关要求进行分装、冻干和融封后，进行协作标定和稳定性研究，最后申报批准使用。在新生物药物的研究开发过程中，生物学活性测定在大多数情况没有国家标准品和国际标准品。在这种情况下的研究者按标准品的制备要求可以自行制备工作标准品，以保证产品的质量。

在建立生物药物质量标准的工作中，质量控制检测方法和相关标准物质是生物药物质量标准的两个重要技术支撑点，完善的质量标准是保证生物药物安全与有效的必要条件。以重组蛋白药物为例，产品的质量控制通常包括以下方面：理化鉴定，结构决定功能，应从一级结构、二级结构及蛋白修饰方面进行鉴定，包括抗原特异性鉴定、分子质量测定、等电点测定、肽图分析、吸收光谱、氨基酸组成分析、二硫键分析、N 末端 C 末端测序等，如果是糖蛋白还需要进行糖基化和结构分析。

（1）生物学活性和比活性：由于生物药物不能像化学药物那样直接用重量单位来决定，因此生物学活性测定是保证药效的重要手段，包括体外细胞培养测定、离体动物器官测定、体内测定等方法，其原理是生物药物作用于动物、器官或体外细胞，并且产生可以量化的生物学效应。

（2）纯度检查：是重组蛋白药物检测的一项重要指标，通常在原液中进行，主要应用 SDS-PAGE、HPLC、毛细管电泳等方法。

（3）蛋白质含量测定：包括凯氏定氮、BCA、Bradford、紫外吸收、HPLC、

SDS-PAGE、ELISA 等方法。

(4) 残余杂质检测：其意义在于避免潜在的毒性和可能对产品药效的影响，同时可以反映工艺稳定性，包括宿主蛋白、宿主 DNA、残余抗生素、残余血清、内毒素含量以及产品相关杂质和工艺中加入的其他物质等。

(5) 安全性及其他检测项目：包括无菌和支原体检测、致热原、异常毒性、免疫原性、水分、装量、pH 等。根据生物药物理化和生物学特性，除重组蛋白药物外，还建立了针对基因治疗及核酸药物、细胞治疗产品和疫苗等生物药物的质量标准体系。

生物药物病毒去除与灭活及病毒安全性评价。生物药物的制备通常采用菌毒种或工程细胞，其生产是一个活体动态培养的过程，因此有受到细菌、真菌、病毒、支原体等病原微生物，即外源因子污染的风险。需要建立各种外源因子检测方法对种子库和生产用原料进行质控；如果生产工艺中存在有病毒污染的风险，还应增加相应的病毒灭活和验证程序。目前对于病毒等外源因子污染的检测方法，除了传统的动物和鸡胚接种实验、针对特异病毒的抗体产生实验、细胞培养观察实验等，还建立了诸如荧光定量 PCR 等高灵敏度方法。

生物制药的发展主要有以下几个趋势：①哺乳动物细胞表达的产品将在相当长的时间内占统治地位；②治疗性抗体将会引领生物制药领域的二次创新高潮；③越来越多的分子质量大、结构复杂的功能蛋白会被开发成生物药物，尤其是用于治疗遗传性疾病的药物；④对已批准上市的生物药物进行化学修饰尤其是 PEG 化以改善药物药代动力学性能；⑤对某些药物的定点突变以获得新型第二代生物药物，如胰岛素、EPO 和 t-PA 的突变体；⑥组织工程、细胞治疗和基因治疗充满了机遇和挑战。

针对日新月异飞速发展的生物制药技术，其质量控制所面临的挑战和难点主要有以下几个方面：

(1) 对于新型的分子质量大、结构复杂的糖蛋白、融合蛋白、各种抗体及不同种类的基因载体，在结构鉴定和理化特性的细节上，分析手段还有待加强。

(2) 生物学活性检测方法日趋多样化和复杂化。除了各类细胞测定方法外，围绕细胞免疫和体液免疫的新技术新方法要不断随着产品特性变化而引入。近来转基因细胞用于生物学活性测定，较传统的动物和细胞试验更加简便和稳定。

(3) 标准物质研究难度大，特别是针对不同特性的目标产品，需要进行不同的配方、相应制备工艺及稳定性评价的深入研究。

(4) 我国关于生物药物的研究开发、质量控制与技术审评的指导原则与国际上还有一定差距。

(5) 对于不断出现的新产品如细胞治疗、纳米材料、肿瘤疫苗和新型佐剂需要开展相应的质量控制技术研究。

参 考 文 献

国家药典委员会 . 2010. 中华人民共和国药典 . 北京 :化学工业出版社

王军志 . 2007. 生物技术药物的研究开发和质量控制 . 北京 :科学出版社

赵铠 ,章以浩 ,李河民 . 2007. 医学生物制品学 . 北京 :人民卫生出版社

Boxu Yan , John Valliere-Douglass , Lowell Brady , et al. Analysis of post-translational modifications in recombinant monoclonal antibody IgG1 by reversed-phase liquid chromatography /mass spectrometry. Journal of Chromatography A , 1164(2007):153～161

Burstyn DG , Hageman TC. 1996. Strategies for viral removal and inactivation. Dev Biol Stand , 88:73～79

Vincent Gueret , Juan A , Negrete-Virgen , et al. 2002. Rapid titration of adenoviral infectivity by flow cytometry in batch culture of infected HEK293 cells. Cytotechnology ,38 : 87～97

撰稿人 :王军志　付志浩

中国药品生物制品检定所

新药发现的高效途径

The Efficient Approaches for Discovery of New Drugs

1. 背景

药物的开发过程是指从药物寻找到应用于临床治疗、诊断、预防疾病的整个过程。有些药物是偶然发现的，有些药物是通过对传统药物中活性成分分离、提纯获得的，有些药物是通过在掌握疾病发病机制、确定治疗靶点的基础上筛选出来的。当前应用的药物，其发现途径多种多样，每一个药物的发现过程都可以成为科技史上的一个故事。

药物的发现过程涉及候选药物的鉴定、提取或合成、理化特征确定、治疗效应的筛选和分析等多个步骤，在此过程中如果确定候选药物具有开发价值，那么该候选药物就进入药物开发阶段。药物开发过程分为两个阶段：临床前研究和临床研究。临床前研究包括的内容有：①药学研究，如药物的合成工艺、提取方法、理化性质及纯度、剂型选择、制备工艺、检验方法、质量标准、稳定性等；②药理毒理研究，如药理学、毒理学、药物代谢动力学等；③中药制剂还包括原药材的来源、加工及炮制等；④生物制品包括菌毒种、细胞株、生物组织等原材料的来源、质量标准、保存条件、生物学特征、遗传稳定性等研究。临床研究阶段包括4期，即新药临床Ⅰ期、Ⅱ期、Ⅲ期、Ⅳ期。新药临床Ⅰ期目的在于了解剂量反应与毒性，进行初步的安全性评价，研究人体对新药的耐受性及药物代谢动力学，以提供初步的给药方案；新药临床Ⅱ期主要对新药的有效性、安全性进行初步评价，确定给药剂量；新药临床Ⅲ期为扩大的多中心随机对照临床试验，旨在进一步验证和评价药品的有效性和安全性；新药临床Ⅳ期是在新药上市后的实际应用过程中加强监测，在更广泛、更长期的实际应用中继续考察疗效及不良反应。一个候选药物经过如上各阶段方可进入市场，对于一个新的化学实体药物来讲，此过程大约需10年时间，花费约为10亿美元。当一个药物进入市场后，如发现严重的不良反应，可能还要面临退出市场的结局。

2. 科学意义

从国际范围来看，药物研发投入的经费越来越多，而每年上市新药品种数量却停滞不前，对许多危害人类健康的重大疾病，如艾滋病、癌症、自身免疫性疾病等尚缺乏有效办法，而人们又不得不付出高昂的医疗费用。这些问题从本质上

讲仍然是人类对疾病发生的机制不清楚，因此没有对因治疗的有效办法。综合生命科学、化学和药学的研究进展，提出新药发现的高效途径，不但能提高人类对疾病本质的认识，而且必将提高人类健康水平。

3. 最新进展

目前人类所应用的药物主要有7方面来源：①植物、②动物、③矿物、④微生物、⑤化学合成、⑥基因工程和⑦系统合成化学。其中，植物、动物、矿物、微生物来源均属天然来源。天然产物在药物研发中具有重要地位，对1981～2006年天然生物化学成分在药物研发中的贡献进行分析显示，974个新化学实体小分子中，有63%是天然衍生物或者是天然产物的半合成衍生物。天然药物也不限于陆地来源，海洋也是新的生物活性物的潜在来源。阿拉伯糖核苷（Arabinose nucleoside）于1950年从海洋无脊椎动物中发现，第一次证明除了核糖和脱氧核糖外，也可有其他糖类形成有生物活性的核苷。第一个海洋来源的新药——大锥蜗牛毒素齐考诺肽（the cone snail toxin ziconotide，也称Prialt）2004年获得批准，用于治疗剧烈的神经性疼痛。

化学合成是药物的主要来源，在未来的很长时间内仍将为人类药物的主要来源。整个20世纪是化学合成药物飞速发展的时期，这期间发明的药物为人类健康做出了重要贡献。化学合成与生物学、药理学、生理学、计算机辅助设计等多学科的紧密结合，是未来药物发明、发现的最可靠、最有效率的途径。基因工程药物主要指通过基因工程方式获得的蛋白类药物。其过程是先确定有药物作用的蛋白质，然后将控制该蛋白质合成的基因转入可以快速繁殖的细胞、细菌中，通过细胞或细菌的大量繁殖，大规模生产蛋白类药物。通过此方式生产的药物有各种疫苗等。系统合成化学（systematic synthetic chemistry）是在人类基因组工程完成之后出现的一种药物发现方式，其机制是首先根据基因信息确定疾病治疗靶点，根据靶点去筛选可能结合的配体，进而确定配体的生物学功能，验证其是否可以成为候选药物。

从自然界中发现新的先导化合物并进行结构改造，这一传统的药物发现方式仍然是当前药物发现的有效途径。人类利用自然界植物、矿物等进行疾病治疗的历史由来已久，在世界各地、不同种族的人群中都存在，并逐渐发展成各自具有一定特征的民族医药学，例如，中国的中医药，印度及其周围国家的阿育吠陀医学、瑜伽等，阿拉伯国家的阿拉伯医学，南美洲及非洲的土著及民间医学，北美洲印第安的传统医学、替代医学，欧洲的顺势疗法、芳香疗法、自然疗法等。

从天然资源中发现新的有生物活性的化学实体，目前主要通过两种途径：①随机采集筛选；②根据现有药学信息寻找。基于地球上的生物多样性，目前只有一小部分资源的药学活性得到测试。此种方式发现药物的成功例子有美国国立癌症研究所始于1960年的抗肿瘤药物寻找，获得了抗肿瘤药物紫杉醇；中国抗

疟药的大规模寻找，获得青蒿素。基于现有药学信息寻找药物的发现方式必须结合药理学、组合化学技术、高通量筛选技术及各种化学分析等技术，此研究过程不单单完成先导化合物的寻找，而且会以先导化合物为基础，完成最适药物效应动力学和药物代谢动力学特征的改良。随着分离、纯化技术水平的提高及结构鉴定技术的改进，快速获得新型结构化合物的效率已经获得极大提高。最近一组研究人员指出他们可以在2周之内从发酵的液体培养基中提出纯的有生物活性的化合物，并且90%的新化合物的结构可以在2周内被阐明。但从获得的提取物中找到期望的有生物活性的化合物并非易事。研究人员因此开发出一些智能检测技术，如通过相关受体结合位点来检测未知活性的提取物，其基本原理是通过比较提取物和已知确定配体在两个受体位点结合效能的比值，预测可能具有适合药理活性的提取物。这项技术的缺点在于仅限于一部分靶标。

我国近年实施了中医药理论与实践及从天然资源中发现新药的宏大计划，最有代表性的计划是“本草物质组计划”。本草物质组计划旨在全面解析中药物质组成、结构和功能，构建本草物质资源库，在继承中医药理论与实践的基础上，本草物质结构组专注于中药的物质基础研究，本草物质功能组专注于中药的生物学功能研究，再结合系统生物学技术和临床再评价，诠释中药多组分多靶点整合调节机制，解读中药的科学性。本草物质组的总体目标是：以中药研究的标准化、资源化、现代化和国际化为目标，以方法学的创新与突破为重点，发展高通量超高效的制备和表征技术与平台，全面解析本草物质基础，创建本草物质、信息和知识资源库；以资源为导向，重点开展本草物质高内涵筛选和系统生物学的研究，阐述中药的物质基础、作用原理及其多组分多靶点整合调控机制，解读中药的科学性，丰富和发展中医药理论；建立完整的知识产权保护体系，为持续、高效的重大创新中药研究提供技术与资源支撑。

提高有效药物的发现效率还有一个重要的方面是药物靶标的确定。基础医学与生物学方面的研究进展提供了海量的药物作用的潜在新靶标，但这些新靶标在疾病的防治方面是否肯定还是很大的问题。目前，新靶标并没有为新药发现带来更多的成功，因而在制药行业中，靶标的确定是个值得争论的话题。药物靶标是指药物将要作用的相应组织、细胞中的特殊结构，如受体、酶等。药物靶标可以分为两类：既定靶标（established target）和新靶标（new target）。既定靶标是指那些有长期研究支持，在正常生理功能和疾病状态中如何发挥作用有令人满意的科学解释的靶标。但这并不意味着作用于既定靶标的药物的作用机制已经完全清楚。对既定靶标的功能信息掌握得越多，通过该靶标开发药物的风险性越小、投资越少。新靶标是指那些基础研究中新发现、并证明具有潜在治疗意义的靶标。通过新靶标开发药物的风险要高于既定靶标。

通过疾病相关的特定靶标可以进行药物筛选，如G-蛋白偶联受体，凡能够

抑制或兴奋该受体的物质都可能成为药物。在此筛选过程中还可以确认该药物对所选靶标的选择性，理想的结果是候选药物只影响所选靶标而不干扰其他相关靶标，这一点很重要，否则该药物在临床应用中可能会出现显著的毒副作用。当然在药物筛选过程中也不能对候选药物苛求完美，有价值而又有缺陷的药物可以通过结构改造获得更优秀的特征，如增加选择性，改善药物吸收、分布、代谢、排泄等特征。

在药物合成方面，近年来也有许多新技术涌现，如点击化学、合成生物学等等。点击化学（click chemistry）近年来尤受关注。点击化学是一种可靠、高选择性合成新化合物的快速合成反应。它采用最简单、最高选择性的化学转变，简化了化合物的合成过程，为快速发现和最优化化合物结构提供了新方法。点击化学的设计及产物分离简单，不需要色谱仪纯化，因此该反应成为制备生物活性化合物的重要手段之一。

药物发现的关键点还在于人类对疾病认识的深度，对疾病发生的本质认识得越清楚，发现有效药物的可能性越大，甚至决定药物发展的走向。如阿尔茨海默病，就 Aβ（β-淀粉样蛋白）靶点来讲，人们已经建立的应对策略就有调节 Aβ 的产生、抑制 Aβ 的聚集、增加 Aβ 的降解，以及针对 Aβ 的免疫治疗等。

4. 主要难点

尽管目前对生物系统已有很深的了解，在药物研发方面也发展了一些新的理论与技术，但药物开发仍然是一个漫长、高耗费、低效率的过程。人类基因组计划的完成曾令药物研发者欢呼雀跃，认为药物开发的瓶颈问题已经解决，新靶点的发现将大大提高药物的发现效率。然而，事实并非如此，新的靶点并没有为新药发现带来更多的成功，2008 年美国 FDA 批准的新的分子实体药物仅有 21 个。近十年来药物发现率没有提高。

5. 展望

关于新药发现的有效途径与方法，不断有新的思路提出，但没有一种万能的方法。不同研究领域的研究者可以从其各自研究角度，提出最佳方案，但毫无疑问，各种理论与技术的综合与整合，才是最有效的方式。

参考文献

国家食品药品监督管理局. 2007. 药物研究技术指导原则(2006～2007 年). 北京:中国医药科技出版社

梁鑫淼，张秀莉，郭志谋，等. 2008.“本草物质组”设想与研究思路. 中国科学基金，6：321～324

Alan L. Harvey. 2008. Natural products in drug discovery. Drug Discovery Today，13：894～901

Colombo M, Peretto I. 2008. Chemistry strategies in early drug discovery: an overview of recent trends. Drug Discov Today, 13(15～16): 677～684

Martin Citron. 2010. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. Nature Reviews Drug Discovery, 9: 387～398

Singh SB, Barrett JF. 2006. Empirical antibacterial drug discovery-foundation in natural products. Biochem Pharmacol, 71(7): 1006～1015

撰稿人:杨宝峰　董德利

哈尔滨医科大学

基于 microRNA 靶点心血管药物的发现

Discovery of Novel Cardiovascular Agents Targeting MicroRNAs

1. 背景

心血管疾病是严重威胁人类健康的重大疾病之一，目前对心血管疾病的防治仍以药物为主，但其高致死率与致残率表明现有的防治措施仍不理想，亟待研发新型防治药物。microRNA（miRNA）是一类新发现的调控基因表达的单链非编码 RNA，它通过与信使 RNA（mRNA）的 3′非翻译区结合而抑制蛋白质的生成，进而参与机体众多生命过程如代谢、程序性死亡、增殖、发育等的调控。miRNA 是表达丰富的一类 RNA，占人类基因组的 3%，大约参与调控 30% 的蛋白质编码基因。截至 2010 年 5 月，miRBase（http：//microRNA. sanger. ac. uk）数据库公布的成熟 miRNA 序列超过了 8600 个，其中 851 个是人源性的 miRNA，而且不断有新的 miRNA 被鉴定出。

2. 科学意义

近几年，miRNA 在心血管系统中的调控作用不断得到阐明，它们通过调节多种心血管系统重要蛋白质的表达而参与心脏发育和心脏的病变过程如心肌肥厚、心力衰竭、心肌病、血管生成及心律失常等。尤其令人兴奋的是以 miRNA 为靶点的心血管系统疾病治疗也取得了初步成功，通过干预单一 miRNA 的表达可以逆转上述疾病的发生发展，miRNA 已经成为一类新的心血管疾病防治靶点。其主要包括：心律失常靶点（miR-1、133 和 590），心力衰竭靶点（miR-1、9、133、129、18b、195、21、23a、23b、24、208 和 212），心肌缺血靶点（miR-1、133、21、320 和 199），心肌纤维化靶点（miR-133、21、29 和 30）等。相信随着研究的深入，将不断有新的 miRNA 靶点被鉴定出来。基于 miRNA 靶点研发的药物主要为基因药物，遵循的策略为：①过表达 miRNA，即通过直接转染 miRNA，抑制致病蛋白的表达；②反义抑制 miRNA 的表达，即通过应用抗 miRNA 反义寡核苷酸（anti-miRNA oligonucleotide，AMO），降低体内 miRNA 的表达量，从而解除 miRNA 对保护蛋白的抑制，增加其表达量。最终使疾病状态得以改善。

3. 最新进展

根据不同的疾病治疗需要选用有效的给药途径是基因药物开发的重要组成部分。现分别对各类 AMO 衍生物在体给药研究进展进行介绍。

（1）腹腔注射：Elmen J 等报道给小鼠腹腔注射完全磷硫骨架锁核酸修饰的寡聚核苷酸（LNA-antimiR）可沉默小鼠体内 miR-122 表达，血浆胆固醇水平呈剂量依赖性下降。

（2）静脉注射：Elmen J 等研究显示，采用非结合的 LNA-antimiR 单一全身给药，可以有效地干扰非人类的灵长类动物体内肝脏表达的 miR-122。给非洲绿猴静脉注射 LNA-antimiR（10mg/kg），使 LNA-antimiR 被摄入灵长类肝脏细胞的胞浆中，LNA-antimiR 与 miR-122 形成稳定的杂交双链。使得成熟 miR-122 缺失和血浆胆固醇水平呈剂量依赖性下降。灵长类体内 miR-122 有效的沉默是通过给予 3 次 LNA-antimiR 实现的，从而使得血浆总胆固醇水平长效而可逆地下降。Thomas Thum 等报道颈静脉注射微小 RNA 拮抗剂 antagomiR-21 可沉默心肌肥厚小鼠心脏表达的 miR-21，同时减少肥厚心肌的间质纤维化，提示 miR-21 参与心肌肥厚调节过程。Jesper W 等报道给小鼠静脉注射锁核酸修饰的寡聚核苷酸（LNA-antimiR）可沉默小鼠体内 miR-155 表达，同时证明 miR-155 参与炎症反应的调节。van Rooij E 等报道尾静脉注射微小 RNA 拮抗剂 antagomiR-29b 可沉默小鼠心脏表达的 miR-29b，调节心脏胶原的合成。此外，Elmen J 等报道尾静脉注射微小 RNA 拮抗剂同样可沉默小鼠肝脏表达的 miR-122，降低血浆总胆固醇水平。另有研究显示，尾静脉注射微小 RNA 拮抗剂可沉默双侧卵巢切除小鼠骨组织表达的 miR-2861，提示 miR-2861 参与骨质疏松的病理调节过程。以上结果提示通过全身性给药反义沉默微小 RNA 是可行的。

（3）器官局部注射：另有研究显示，应用心脏局部多点注射转染技术将 miR-1 特异性反义寡聚（脱氧）核苷酸（AMO-1）导入缺血心肌时，心律失常发生率明显降低。但是这种在体转染给药途径对心脏有创伤，所以限制了其在临床上的应用范围。Ji 等在颈总动脉局部给以微小 RNA 拮抗剂 2′O-Me-Anti-miR-21 沉默小鼠血管平滑肌细胞表达的 miR-21，提示 miR-21 参与血管新生内膜损伤过程。

（4）皮下给药：Alessandra Care 等使用皮下埋植微渗透泵微小 RNA 拮抗剂 antagomiR-133 沉默小鼠心脏表达的 miR-133，从而对心肌肥厚指标产生影响，提示 miR-133 参与心肌肥厚的调节过程。

4. 主要难点

目前，对体内 AMO 递送方法的研究、应用都很有限，现在广泛使用的 AMO 是对磷酸骨架、核糖和碱基进行了化学修饰的 AMO 的衍生物，比较常用的是胆固醇连接 AMO（cholesterol conjugated AMO，antagomiR）、锁核苷酸修饰 AMO [locked nucleic acid（LNA）-modified oligonucleotides，LNA-antimiR] 及沉默微小 RNA 的 DNA 酶等，这些 AMO 衍生物在体内具有防核酶降解、易于转运等特点，但同时它们造价昂贵，有效剂量过大，又有细胞毒性、对靶序列亲和力较低、主要靶向肝脏器官等弱点。

5. 展望

关于 miRNA 的药物研究还有一些不确定的问题需要解决，体内递送方法特别有必要对比研究在相同的实验条件下不同递送方法和对不同细胞类型的有效性和毒性，以及不同递送方法的细胞特异性或非特异性；更要重点研究在血清中能够保持活性的递送载体，因为这是进一步发展体内递送体系的先决条件；至于作用机制方面，要弄清 AMO 在细胞内累积到什么程度才能发生反义沉默作用。在这些方法中，作用于细胞膜提高膜通透性的递送方法很有发展前景。

总之，由于对 AMO 递送体系的药物动力学和药效学已经有了一定的了解，所以人们会研究出更好的递送体系和更有效的给药途径。可以预见，AMO 有效递送问题的解决最终必将使 AMO 在临床上得到广泛应用。

参考文献

Bartel DP. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell, 116: 281～297

Care A, Catalucci D, Felicetti F, et al. 2007. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. Nat Med, 13: 613～618

Chua JH, Armugam A, Jeyaseelan K. 2009. MicroRNAs: biogenesis, function and applications. Curr Opin Mol Ther, 11(2): 189～199

Elmén J, Lindow M, Silahtaroglu A, et al. 2008. Antagonism of microRNA-122 in mice by systemically administered LNA-antimiR leads to up-regulation of a large set of predicted target mRNAs in the liver. Nucleic Acids Res, 36(4): 1153～1162

Elmén J. 2008. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. Nature, 452: 896～902

Jesper W. 2009. Silencing of microRNA-155 in mice during acute inflammatory response leads to derepression of c/ebp Beta and down-regulation of G-CSF. Nucleic Acids Research, 37(17): 5784～5792

Latronico MV, Condorelli G. 2009. MicroRNAs and cardiac pathology. Nat Rev Cardiol, 6(6): 419～429

Pan ZW, Lu YJ, Yang BF. 2010. MicroRNAs: a novel class of potential therapeutic targets for cardiovascular diseases. Acta Pharmacol Sin, 31(1): 1～9

Thum T, Gross C, Fiedler J, et al. 2008. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. Nature, 456(7224): 980～984

Yang B, Lin H, Xiao J, et al. 2007. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. Nat Med, 13(4): 486～491

撰稿人：杨宝峰　潘振伟　初文峰

哈尔滨医科大学

新药发现与网络药理学

New Drug Discovery and Network Pharmacology

传统新药研发的模式是“单靶点-单药物-单一疾病”，这种药物开发的策略对疾病的分类、靶点的鉴定、新药设计和筛选，以及临床试验的设计都产生了深远的影响。但近10年来，新药候选物被批准进入临床应用的比例明显降低，许多因为药效和毒副作用而夭折在Ⅱ～Ⅲ期临床试验阶段。新药研发的失败率达30%，受挫的新药主要集中在复杂疾病上，如心脑血管疾病、肿瘤、糖尿病和神经退行性疾病等，导致国际制药工业成本上升，效率下降。高选择性配体的研发过程因其在临床治疗上有效性低并产生了没有预料到的不良反应，使得我们对原有的研发模式不得不重新思考。最新研究发现，对许多疾病有效的药物都作用于多靶点而非单一靶点，同时发现疾病的病理生理改变往往是多方面或受多种机制调控的。因此，对新药研发的战略提出了挑战，是坚持已有的方向，开发单基因/靶点药物，还是开发多靶点药物，已成为药学界的重大科学方向问题。对此，药学界的相关呼声越来越高。对复杂疾病的新药开发研究要想有所突破，必须变革我们的传统思想和研究方法。但在不同的疾病中哪些靶点真正有治疗意义、如何调控这些靶点呢？这是一个新的前沿学科要解决的问题。在功能基因组学、蛋白质组学、系统生物学快速发展的基础上，网络药理学概念应运而生。

系统生物学快速发展为复杂疾病药物开发提供了新的平台，相继而生的网络药理学为新药研发打开了另一扇窗。系统生物学认为机体是一个复杂的网络系统，其间无数个大小网络通过层次与层次之间、网络与网络之间、系统与系统之间进行联系和整合。其通过不同网络之间的信息传递和整合，使基因或蛋白质产生出最终的生物学功能。并且生物体有适应环境变化的多样功能和旁路代偿的信号通路。疾病的发生和发展必然牵涉网络中的诸多环节。当今严重威胁人类健康的恶性肿瘤、心脑血管疾病、神经退行性疾病和一些代谢紊乱疾病都是多因素作用的结果，往往不能归结于单一因素的变化。因此，不能通过干预单一靶点而奏效。网络生物学认为，新药开发的策略应是针对多种病理因素或多个基因及其调节蛋白进行干扰，从而干扰疾病的病理网络，而非与疾病相关的个别基因。网络药理学是一种药物设计的新方法，包含网络生物学、网络的拓扑结构分析、节点的连通性、冗余和多向性。它将药物-靶点与生物网络结合在一起，分析药物在此网络“中心”与特定“节点”上的作用，就可理解药物的有效性和毒性。网络

药理学提供了一个开发药物的思考方式——既要改善临床疗效又要兼顾药物的副作用和毒性。

发展网络药理学的关键在于：通过网络分析，发现可产生药效的关键节点或节点组合；开发出可干扰这些关键节点，产生多项药理学效应的化合物。目前，药学家和药理学家研究的思路已经逐步转移到研制多靶点药物的方向上。在多靶点新药设计和开发方面，应注意以下几点：①可采用鸡尾酒疗法对多药进行组合，但存在多药相互作用的风险。②在同一药物载体中含多组分配伍药物，但要注意各组分在药物代谢动力学上的差异，配伍使用时的安全性。③设计作用于多靶点的单一化合物药物，它应对不同靶点具有适当（不过强）的亲和力（因为适当或较平衡的亲和力能稳定整个系统，而且不良反应少）。对单一药物的剂量控制优于多药组合。另外，从药品注册的角度，作用于多靶点的单一药物要比多药组合（复方药物）容易得多。④药物的网络调节关键在调节位点，因此药物设计中应注重调节关键节点（蛋白）的组合，而非任意节点的组合。⑤要重视整体动物实验，综合考察药物的作用效果。

目前，网络药理学的研究刚刚起步，处于初期探索阶段。网络药理学的发展，依赖于疾病的基因组学、蛋白质组学、代谢组学等多学科的发展。随着我们对疾病基础研究的深入，发现更多与疾病发生密切相关的关键节点，网络药理学才能进入快速发展通道。我们认为，基于网络药理学的新药设计研发模式，将为今后重大复杂疾病的新药开发带来重大突破。

参考文献

潘家祜. 2009. 基于网络药理学的药物研发新模式. 中国新药与临床杂志, 28 (10): 721～726

Dessalew N, Workakemahu M. 2008. On the paradigm shift towards multitarget selective drug design. Curr Comput Aided Drug Des, 4 (2): 76～90

Hopkins AL. 2007. Network pharmacology. Nat Biotechnol, 25 (10): 1110～1111

Hopkins AL. 2008. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. Nat Chem Biol, 4 (11): 682～690

Keith CT, Borisy AA, Stockwel BR. 2005. Multicomponent therapeutics for networked system. Nat Rev Drug Discov, 4 (1): 71～78

Kola I, Landis J. 2004. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? Nat Rev Drug Discov, 3 (8): 711～715

撰稿人：王晓良　彭　英
中国医学科学院药物研究所

心肌重塑的药物逆转

Inversion of Cardiac Remodeling by Drugs

心肌重塑是在持久性病理应激的作用下心脏功能从代偿期向失代偿期演变、心脏结构从可逆转向不可逆转发展的一个阶段，可表现为心肌细胞肥大、非肌性细胞（主要是心肌成纤维细胞，cardiac fibroblast，CFb）增殖及心肌纤维化（cardiac fibrosis），继而出现心腔扩张与心脏重量增加，是多种心肌损伤的共同结局。心肌重塑的发生使胶原含量增加、细胞外基质沉积，导致室壁僵硬、顺应性降低，心脏收缩、舒张功能受限；氧弥散至心肌细胞的距离加大；过多的基质使心肌细胞分离，心肌细胞间的电偶联作用减弱，以上改变最终均会导致心律失常、心力衰竭，甚至心脏性猝死。心肌重塑是心血管病重要的病理生理过程，是导致心力衰竭病因去除后慢性心力衰竭仍然不断进展的机制之一，同时也增加了致命性心律失常的危险性。左心室重构与心脏事件密切相关，是多种心血管并发症的独立预测因素，有效抑制心肌重塑可以预防猝死的发生。因此，在目前日益重视提高医疗质量、减少重复住院率、降低病死率的前提下，寻求有效的抑制心肌重塑的药物，明确其治疗靶点及细胞内信号转导机制已成为医学研究中备受关注的课题。

在细胞和分子水平上，心肌重塑的发生基于三个环节：细胞外刺激信号、细胞内信号转导及核内基因转录的活化。血管紧张素Ⅱ（AngⅡ）是最为常见的细胞外刺激信号，是引起心肌重塑的关键物质。胞内信号转导通路主要是磷脂酰肌醇-3激酶（PI3K）-蛋白激酶B（Akt）-糖原合成激酶-3（GSK-3）系统（简称PI3K-Akt-GSK-3系统）、钙调神经磷酸酶（calcineurin，CaN）-活化T细胞内核因子（nuclear factor of activated Tcell，NFAT）系统（简称CaN-NFAT系统）和蛋白激酶C-丝裂素活化蛋白激酶（MAPK）系统（简称PKC-MAPK系统），这三条通路之间存在相互作用，其中前两条通路在心肌重塑中的作用已研究得较为深入。已有证明经典PKC，即PKC（α和β）参与了心肌纤维化过程。在糖尿病大鼠的心力衰竭模型中，应用Ruboxistaurin可以改善心脏收缩功能，减少心肌肥大和胶原沉积。但在PKC-MAPK通路中关于PKC各亚型在心肌重塑中表达的规律性变化是基础研究涉及较少的领域。

研究表明，活性氧（reactive oxygen species，ROS）和Nox2 NADPH氧化酶的活化参与了AngⅡ诱导的心肌肥大和纤维化过程：①氧自由基能直接与蛋

白质、DNA 和脂质体反应，引起蛋白质氧化、DNA 链断裂、细胞膜脂质过氧化等，从而导致心肌细胞程序性死亡；②氧自由基通过激活 NF-κB 参与心肌重构；③氧自由基通过激活丝裂原活化蛋白激酶家族参与心肌重构；④Nox2 NADPH 氧化酶活化后提高基质金属蛋白酶的激活，促进 CTGF 和 TGF-β 的表达，引起心肌肥大和纤维化。以上表明氧化应激参与心肌重构过程，因而使牛磺酸、卡维地洛、丹参等抗氧化剂治疗心肌重塑成为可能。

但至今关于抗氧化剂药物抑制心肌重塑的作用靶点研究仅停留在减少Ⅰ型、Ⅲ型胶原的基因表达，降低心肌、血浆中 AngⅡ含量，抑制 TGF-β1 的合成，拮抗心肌细胞内［Ca^{2+}］的升高，提高氧自由基清除能力，NO 升高等单一性指标的检测，上述研究均未深入到细胞内信号转导通路水平。鉴于此，在研究上述三种抗氧化剂对心肌重塑的抑制作用时，着重要探讨其细胞内信号转导的分子机制，为药物作用靶点的确定提供佐证及理论支持，从而为临床心肌重塑的药物治疗提供新靶点、新理论。

目前可抑制心肌重塑的药物主要有血管紧张素Ⅰ转换酶抑制剂（ACEI）、血管紧张素Ⅱ受体阻滞剂（ARB）、醛固酮拮抗剂、肾上腺素受体阻滞剂、钙通道阻滞剂等。ACEI 药物可以减少 ACE 途径 AngⅡ的生成，但它并不抑制糜酶途径 AngⅡ生成，并且不能完全抑制组织来源的 RAAS，在治疗过程中会发生“逃逸”现象，即用药几个月时可出现 AngⅡ和醛固酮水平增高的现象，同时 AngⅡ可激活 AT1 受体，从而引发一系列的生物学效应，如心肌细胞肥大、程序性死亡和成纤维细胞增殖等。因而对 AT1 有直接拮抗作用的药物——ARB 日益受到人们的重视。ARB 直接阻断 AT1 可以同时阻断 ACE 和糜酶生成途径 AngⅡ对 AT1 受体的激活作用，从药理学理论上讲 ARB 具有更确切的临床疗效。ACEI、ARB、醛固酮受体拮抗剂都有保钾倾向，易引起高钾血症。有研究显示，第二代和第三代β受体阻滞剂可以以时间依赖性方式逆转原发性或继发性心肌重塑，可以减少远离梗死区域的胶原沉积，但易引起直立性低血压、支气管痉挛，加重外周循环性疾病，造成心动过缓和传导阻滞等。由于其不良反应的存在，限制了它们的临床应用。目前总体研究表明，选择性高、副作用少的此类药物仍有待进一步研究与开发。

在过去的几十年中，一直应用 ACEI、ARB、ALD 拮抗剂、β受体阻滞剂和抗氧化剂来逆转心肌重塑，进一步通过调控神经内分泌因素抑制心肌纤维化却没有取得有重大意义的进展。这就提示我们，只有通过开发和研究新的治疗措施去干预心肌纤维化和逆转心肌重塑，才有可能进一步有效地控制心肌重塑并发的心力衰竭、心律失常及猝死的发生率和病死率，提高医疗质量、减少重复住院率、降低病死率，有望在不久的将来为抑制心肌纤维化和逆转心肌重塑的治疗带来新的曙光。

参 考 文 献

陈书琴,陈桃,周太光. 2009. 血管紧张素Ⅱ对新生大鼠心肌成纤维细胞增殖及其信号转导机制的影响. 实用儿科临床杂志,24(13):1001~1003

王艳春,关凤英,李红,等. 2009. 牛磺酸通过抑制PKCα抗心肌成纤维细胞增殖的作用. 药学学报,44(6):591~596

王艳春,李红,杨世杰. 2008. 牛磺酸对新生大鼠心肌成纤维细胞一氧化氮系统的影响. 中国生物制品学杂志,21(1):8~11

杨世杰. 2005. 药理学. 北京:人民卫生出版社,305

Boyle AJ, Kelly DJ, Zhang Y, et al. 2005. Inhibition of protein kinase C reduces left ventricular fibrosis and dysfunction following myocardial infarction. J Mol Cell Cardiol,39:213~221

Connelly KA, Kelly DJ. 2009. Inhibition of protein kinase C-beta by ruboxistaurin preserves cardiac function and reduces extracellular matrix production in diabetic cardiomyopathy. Circ Heart Fail,2(2):129~137

KobayashiN, Yoshida K, Nakano S, et al. 2006. Cardioprotective mechanisms of eplerenone on cardiac performance and remodeling in failing rat hearts. Hypertension,474 : 671~679

Wang MY, Zhang J, Simon J Walker, et al. 2010. Involvement of NADPH oxidase in age-associated cardiac remodeling. J Mol Cell Cardiol,48(4): 765~772

Wu HY,Tomizawa K,Oda Y,et al. 2004. Critical role of calpain-mediated cleavage of calcineurin in excitotoxic neurodegeneration. J Biol Chem,279(6):4929~4940

撰稿人:王立英[1]　杨世杰[2]

1 北华大学

2 吉林大学

分子靶向药物如何实现杀伤肿瘤细胞

How Do Molecular Targeted Drugs Kill Tumor Cells

1. 背景

抗肿瘤药物的主要治疗目的是有效地根除恶变的肿瘤细胞，而尽量不伤害正常细胞。无论抗肿瘤药物的特性如何，都需要一个靶向给药技术使其靶向作用于肿瘤细胞，而不损害正常细胞。目前抗肿瘤药物靶向给药已经取得了显著的进步，但是大部分靶向给药系统仍不能很好地区分肿瘤细胞和正常细胞。在所有的分子靶向给药系统中，受体-靶向给药系统是最具创新性、最为有效的肿瘤药物靶向给药技术。受体-结合配体（如多肽、抗体等）与药物混合或与药物共价结合将携带药物直接作用于表达该特定受体的肿瘤细胞，从而实施最为有效的杀伤肿瘤细胞作用。

2. 科学意义

将生物活性药物（细胞毒药物、放射性核素、细胞因子和小核苷酸等）特异性地运达肿瘤组织或细胞而非健康组织或细胞的益处显而易见。药物在肿瘤局部维持较高浓度而在正常组织浓度尽量低，不但提高了杀肿瘤细胞的药效，同时有效地降低了药物的副作用。

3. 最新进展

实验研究表明，抗体、脂质体等可促进治疗药物在肿瘤组织或细胞的停留。其中，最有效的途径是将能够识别肿瘤细胞特异性表达受体的配体与治疗药物偶联，配体药物偶联剂通过配体-受体识别、受体介导的细胞内吞作用，从而使肿瘤细胞特异性地摄取药物。肿瘤微环境的改变，如肿瘤细胞表面蛋白酶表达增加、血管生成增加将更有助于增加该靶向给药途径的治疗指数。目前，这种特异性识别肿瘤细胞表面表达受体的靶向杀肿瘤途径主要包括三种，即抗体、多肽、肽激素偶联物介导的靶向杀肿瘤途径。寻找肿瘤细胞表面特异性的分子靶标，以此筛选最有效的配体，是构建分子靶向药物的主要难点。

(1) 抗体介导的靶向杀伤肿瘤细胞：肿瘤细胞表面分子呈现高度的特异性，以这些特异性表达分子作为靶标，能够直接识别它们的药物则可直接作为抗肿瘤药物或载药剂。目前，抗体治疗肿瘤已经有几个成功的范例，尤其是赫赛汀（Herceptin）和利妥昔单抗（Rituxan）。赫赛汀可以靶向识别乳腺癌的一种亚型所表达的 Her-2 抗原。利妥昔单抗是 CD20 的抗体，可识别淋巴瘤细胞上的

CD20，从而有效治疗非霍奇金淋巴瘤。此外，一些未修饰的单克隆抗体也显示了一定的治疗潜力，但是这些抗体的治疗效果差异较大，如果未与经典的化疗药物联合使用往往不能达到治愈目的。而且，这些抗体达到治疗效果时的使用剂量往往很大，因此导致了严重的副作用。因此，研究人员开始研发新的技术将这些抗体与药物、毒素或放射性核素偶联，以期获得有效的分子靶向药物。但是，这种新偶联药物也增加了临床前试验和临床试验的复杂性。

（2）多肽介导的靶向杀伤肿瘤细胞：与抗体相比，多肽具有更好的穿透力和更低的免疫原性。以研究最为深入的细胞透膜肽（cell-penetrating peptide，CPP）为例，这些序列往往包含较大比例的碱性氨基酸，如精氨酸和赖氨酸。由于碱性氨基酸在 pH 中性时带正电荷，这样带大量正电荷的多肽可以与带负电荷的细胞膜发生强有力的相互作用。CPP 与细胞膜相互作用后，大量的 CPP 可独立地或携带体积更庞大的各类药物跨越细胞膜，其携带的药物既可为小分子药物、反义核苷酸、siRNA，也可为质粒、多肽甚至大分子的蛋白质。虽然 CPP 能够调节药物的细胞内吞，但是它们的细胞选择性很有限。因此，研究人员目前越来越感兴趣的是研发能够特异性识别肿瘤细胞表面特异性受体的多肽。这种分子靶向给药将有效地提高药物在肿瘤区域的浓度，降低药物在全身正常组织的浓度。虚拟组合肽文库、生物活性肽文库的出现使筛选结合肿瘤细胞膜受体的多肽成为可能。目前，已经从随机肽文库中筛选出几种 ErbB-2 结合肽，其中一种多肽（KCCYSL）已被证实能与纯化的人 ErbB-2 受体的细胞外结构域相结合。这类研究虽然尚未进入体内试验研究阶段，但是为多肽介导的靶向杀伤肿瘤途径点燃了希望。

（3）肽激素偶联物介导的靶向杀伤肿瘤细胞：近期研究表明，几种激素受体在人体正常组织表达的同时，在肿瘤组织却呈现过表达，为肿瘤的诊断和治疗提供了新的靶标。例如，促黄体生成激素释放激素受体（luteinizing hormone-releasing hormone，LHRH）在乳腺癌、卵巢癌和前列腺癌中过表达。神经肽 Y 受体在一些内分泌肿瘤和上皮来源的恶性肿瘤、尤其是乳腺癌中过表达。人胃泌素释放肽受体在很多肿瘤细胞上都过表达，如前列腺癌、乳腺癌、肺癌和胰腺癌。生长抑素受体在很多神经内分泌肿瘤上过表达，如小细胞肺癌、类癌瘤、胰岛素瘤、胃泌素瘤和髓样甲状腺癌。上述例子表明不同激素受体或生长因子受体在不同的肿瘤细胞表面往往过表达。因此，这些肽激素与治疗药物形成的偶联物将有助于肿瘤细胞的靶向杀伤。目前，几个研究小组通过放射性标记肽激素或分子成像诱导药的方法研究了肽激素的靶向杀伤肿瘤效果。例如，细胞毒药物与 LHRH 肽偶联后可提高表达 LHRH 受体的肿瘤细胞内细胞毒药物的浓度。人胃泌素释放肽的类似剂也表现出良好的肿瘤靶向性。同样，生长抑素类似剂可用作生长抑素受体阳性表达肿瘤的诊断显影剂。值得关注的是，生长抑素受体是第一

个以受体为靶标、用于肿瘤诊断与治疗的肽激素受体。因此，肽激素偶联物介导的靶向杀伤肿瘤细胞是十分令人鼓舞并具有广泛前景的肿瘤靶向治疗技术之一。

4. 展望

进入21世纪的今天，分子靶向治疗已经不再是一个新名词。科学家们在不断探索肿瘤的分子生物学发病机制时，就意识到如果能够针对肿瘤细胞表面表达的特异性分子给予最有力的打击，将会大大改善治疗效果，从而引发了抗肿瘤治疗理念的变革。随着肿瘤靶向研究的不断发展，令人欣喜的是一些靶向抗肿瘤药物或靶向给药技术已经用于临床并取得了显著的进步。然而有些靶向技术仍不能十分有效识别肿瘤细胞，不能将药物对正常细胞的损害降至最低。特异性靶向肿瘤细胞表面受体的配体将是靶向杀伤肿瘤细胞最有效的途径。

参考文献

Alaoui-Jamali MA, Qiang H. 2003. The interface between ErbB and non-ErbB receptors in tumor invasion: clinical implications and opportunities for target discovery. Drug Resist, 6(2): 95～107

Dharap SS, Wang Y, Chandna P, et al. 2005. Tumor-specific targeting of an anticancer drug delivery system by LHRH peptide. PNAS, 102(36): 12962～12967

Garanger E, Boturyn D, Dumy P. 2007. Tumor targeting with RGD peptide ligands-design of new molecular conjugates for imaging and therapy. Anticancer Agents Med Chem, 7(5): 552～558

Karasseva NG, Glinsky VV, Chen NX, et al. 2002. Identification and characterization of peptides that bind human ErbB-2 selected from a bacteriophage display library. J Protein Chem, 21(4): 287～296

Körner M, Reubi JC. 2007. NPY receptors in human cancer: a review of current knowledge. Peptides, 28(2): 419～425

Romanov VI. 2003. Phage display selection and evaluation of cancer drug targets. Curr Cancer Drug Targets, 3(2): 119～129

Ross J, Gray K, Schenkein D, et al. 2003. Antibody based therapeutics in oncology. Expert Rev Anticancer Ther, 3(1): 107～121

Sawant R, Torchilin V. 2010. Intracellular transduction using cell-penetrating peptides. Mol Biosyst, 6(4): 628～640

Slaby O, Sachlova M, Bednarikova M, et al. 2010. Gene expression of somatostatin receptor 4 predicts clinical outcome of patients with metastatic neuroendocrine tumors treated with somatostatin analogs. Cancer Biother Radiopharm, 25(2): 237～243

撰稿人：张志仁　赵　丹

哈尔滨医科大学

以病毒靶点为导向筛选有效的抗病毒药

Screening Effective Antiviral Drugs Based on Virus Targets

病毒（virus）是1898年荷兰年轻的细菌学家马丁努斯·威廉·贝杰林克（Martinus Willem Beijerinck）首次提出的，是一类体积微小的非细胞型微生物，直径20～300nm，能通过细菌滤器。它的结构简单，只含有携带遗传信息的核酸和保护核酸的蛋白质外壳。一般生物细胞中的核酸都含有DNA和RNA两种，但病毒却仅含其中的一种，分别称为DNA病毒或RNA病毒。病毒所拥有的蛋白质外壳称作衣壳（capsid）。有的病毒还有包膜，包膜上有一些钉状突起，称为包膜子粒或刺突。病毒形态多样，有球形、杆形、子弹形、砖形、蝌蚪形等。病毒有5500多种，我们比较熟悉的能引起人类疾病的有麻疹病毒、脊髓灰质炎病毒、带状疱疹病毒、腮腺炎病毒、出血热病毒、狂犬病毒、流感病毒、SARS病毒、肝炎病毒、ADIS病毒等，原有的天花病毒已经绝迹。

病毒本身是不能复制或繁殖的，必须巧妙地“钻进”合适的活细胞（即宿主细胞）中，“劫持”细胞的生命装置为它提供原料、能量、酶和合成场所才能进行增殖。病毒的增殖过程大致分为吸附、侵入、脱壳、合成、组装和释放等六个阶段。暴露在病毒包膜上的突起或刺突是病毒侵入细胞的吸附蛋白质，以很快的速度吸附于细胞表面的某些蛋白质，然后以各种手段侵入细胞，有的是冒充营养物质混进细胞内，有的是将核酸注入细胞内而外壳留在细胞外，还有的是以病毒包膜与细胞膜融合后进入。到了细胞内，带着外壳和包膜的病毒利用细胞内的蛋白水解酶将外壳和包膜降解，游离出核酸。随即病毒核酸“劫持”宿主细胞原料、能量和场所悄悄地大量合成自己的核酸和蛋白质，而后在细胞核内或细胞质内组装成新的病毒。新病毒以出芽方式逐个释出，宿主细胞随后便死亡。一个感染细胞释放的病毒数为100～1000个。新病毒又去寻找其他健康细胞，开始了下一轮的增殖。

病毒引起的疾病发病率高、传播快、危害大，居传染病之首（约占60%以上）。历史上全世界每隔十几年就有一次大的病毒性疾病流行，每当瘟疫发生时，全城的人难以幸免，甚至是整个城市消失。1918～1920年的大流行造成的死亡人数估计有2000万，被称为人类历史上最大的瘟疫。2003年的“非典”使人们记忆深刻，病毒引起的疾病总是与死亡紧密联系在一起，让人们无不感到恐惧和无奈。然而，人类没有退缩，仍顽强地与病毒进行斗争。

天花早在公元前 2～3 世纪就出现在中国，勤劳和聪明的中国先人发现接触过天花患者的人有的发病轻，有的甚至不发病，随即就把病孩的衣服或用品给健康的孩子穿用，到了公元 10 世纪宋真宗时代就有接种人痘预防天花的记载了。16 世纪的明代则已经发明了用患者的皮痂磨成粉末通过鼻孔接种来预防此病的方法。清代时期出版了医学著作《种痘心法》，成立了“痘局”专管天花的防治工作。人痘接种法的发明，可以说是我国对世界医学的一大贡献。1796 年英国医生爱德华·琴纳（Edward Jenner）接种牛痘预防天花试验成功，为人类灭绝天花奠定了基础。现在人类利用免疫学原理能够战胜一部分病毒性疾病，但是还不能战胜全部病毒性疾病。原因是有的病毒包膜蛋白表面抗原性稳定，而有的就不稳定，容易发生变异，使接种的疫苗或产生的抗体失效，如每次发生的流感病毒都不一样。还有的病毒没有包膜，甚至连外壳都没有，使得人们至今都找不到这些病毒的“命门”。

除了疫苗以外，世界各国也在加紧研究抗病毒新药以对付那些“狡猾”的病毒。和抗菌药的发展相比，抗病毒药发展很慢。主要原因一是病毒侵入到细胞里面并在那里生活，很难找到一个药物既能杀死病毒而又不损伤细胞；二是很多病毒只在人体中生存，不能在动物体内存活，没有动物模型，药物的研发就很困难。

目前抗病毒药研发的焦点是寻找病毒增殖周期六个阶段中的关键性蛋白或酶，作为药物攻击病毒的“靶点”。比较成功的抗病毒药物有“达菲”，药品名为奥司他韦，是治疗流感的特效药，作用的靶点是位于流感病毒包膜表面的神经氨酸酶。在细胞内该酶可以解除组装好的病毒与宿主细胞之间的联系，使之可以自由移动并侵入其他健康宿主细胞。抑制神经氨酸酶的活性可以阻止病毒的释放，切断病毒的扩散链。科学家通过 X 射线衍射的方法获得了神经氨酸酶的三维结构，并找到了该酶的活性中心。此活性中心的形状像一个口袋，在开口处和底部各有活性基团，设计者据此设计了相应的药物结构，使药物“钻入”口袋内部，将活性基团封闭而发挥疗效。该药在起病后 24 小时内服用，病程会缩短 30%～40%，病情会减轻 25%，作为预防用药，保护率为 80%～90%。

抗病毒药物长期应用会使病毒产生耐药性，降低疗效，使病情复发，这成了临床治疗及新药开发的重要问题。同时，病毒的种类众多，“靶点”各异，给新药研发带来了更大的困难。中国传统医学在对付病毒性疾病时另有招法，采用增强机体抵抗力、驱逐病毒至机体之外的“扶正祛邪”治疗原则，根据发病时机体状况、外界环境气候条件，实行辨证施治、个体化治疗。历史证明，祖国传统医学在防治病毒性疾病的流行中为世界做出了重要贡献。远的不说，在 2003 年防治“非典”期间所取得的成就得到了世界卫生组织的肯定和赞扬。我们期待着现代医学和祖国传统医学共同合作，相互借鉴，兼容并蓄，发挥各自的优势，在防

治病毒性疾病中为人类做出贡献。

参 考 文 献

陶佩珍．2006．抗病毒药物耐药及耐药机制研究进展．中国抗生素杂志，31(2)：72～79

印大中，卢传坚．2009．从模糊数学看中医药抗病毒的科学性．医学与哲学(人文社会医学版)，30(2)：78～79

照日格图．2008．抗病毒药物研究进展．中国感染控制杂志，7(3)：145～151

Bardsley-Elliot A，Noble S. 1999. Oseltamivir. Drugs，58(5)：851～860

Lew W，Chen X，Kim CU. 2000. Discovery and development of GS 4104 (oseltamivir)：an orally active influenza neuraminidase inhibitor. Curr Med Chem，7(6)：663～672

撰稿人：娄建石
天津医科大学

新型神经系统保护剂

New Neuroprotective Agents

神经保护剂是指能预防、减缓或逆转各种因神经损伤而引起的神经细胞死亡和保护脑功能的药物，主要用于脑血管疾病、脑外伤、脊髓损伤、老年性痴呆（阿尔茨海默病，AD）、帕金森病（PD）、亨廷顿病、肌萎缩性侧索硬化症（ALS）、多发性硬化症（MS）、癫痫、缺血性视神经病变及视网膜变性等的治疗和功能恢复。脑梗死、阿尔茨海默病、帕金森病等的发生都与年龄密切相关，随着人口老龄化的加剧，发病率逐年增加。因此，寻找新的神经保护剂是神经系统药物开发的重点。

现有的神经保护剂种类众多，包括自由基清除剂、兴奋性氨基酸拮抗剂、程序性死亡抑制剂、抗炎药物、离子通道调节剂、神经营养因子等。但已有的神经保护药物的疗效均不够满意，因此迫切需要开发出新的神经保护剂。据 2010 年 6 月出版的《神经保护：药品、市场、企业研究报告》中报道，目前已有 500 多种神经保护剂先后进入临床试验阶段，150 多家制药企业正在进行神经保护剂的研制开发。数字是惊人的，但令人感到沮丧的是这些在细胞水平和动物实验证实有明确疗效的药物，在随后的Ⅱ期和Ⅲ期临床试验阶段因为有效性和安全性的问题大都失败。造成这种困境的原因是多种多样的，既有动物实验自身和总体设计上的缺陷，也有从动物实验过渡到临床试验时出现的缺陷。主要的原因可能是：①动物模型并不能完全恰当地模拟人类的疾病，疾病动物模型的表型比较一致，但实际患者的变异程度较大。②人类疾病的病理生理机制与动物存在着本质的不同，大多数实验动物的脑小于人脑，其发育程度也落后于人脑。③临床试验中可能存在设计缺陷。神经保护剂多数用于神经退行性疾病的治疗，需长期治疗，且患者多为老年人，常伴随有多种疾病。因此在临床试验的设计上，在给药剂量、治疗时间窗、患者的严重程度、试验的终点目标和受试者的选择方面容易出现偏差。④另外一个重要原因是，神经保护的有效靶点没有得到确认，不能有的放矢地研发这类药物，或者说现阶段药物都是采取对症治疗的方法，没有解决根本问题。上述问题的存在也说明了一个重要的科学难题，即神经组织不像机体内其他组织一样，往往是不可逆的损伤，难以进行修复。因而现有神经保护剂的作用主要是防止新的神经元损伤。

迄今为止，美国食品药品监督管理局仅批准了两个神经保护剂：用于肌萎缩性侧索硬化症治疗的利鲁唑（Riluzole）和阿尔茨海默病治疗的美金刚（Memantine），它们都是通过阻止脑内谷氨酸的兴奋性毒性而发挥神经保护作用的。依

达拉奉（Edaravone）是一种自由基清除剂，最近在日本已批准上市用于脑梗死的治疗，在我国也广泛应用于临床。

难以实现从实验室到临床应用的成功转化，严重阻碍了神经保护剂的研制开发。但要解决这个难题是一个系统工程，涉及从基础到临床的多个环节。首先要解决的问题是进一步搞清不同情况下神经元损伤的病理机制，进而确定保护神经元的药物作用有效靶点，有利于设计出新型分子结构的神经保护剂。如针对抗缺氧、加强神经元的耐受能力、抗中枢神经系统炎症、抗程序性死亡及发挥中枢胶质细胞对神经元的保护作用等，尚无有效药物，均为目前研究的热点。此外，建立、开发出一批更符合人类神经损伤性疾病的动物模型也是新药开发的关键所在。最后，在临床试验中研究者和临床医生应尽可能完善地设计试验方案，就试验中的样本量、患者的病情发展阶段、患者的其他疾病状况、开始给药的时间点、持续时间、给药剂量、试验的终点目标、主要终点目标的统计学分析等多方面综合考虑，尽量避免偏差。此外，联合用药也是一种新的发展趋势，鸡尾酒疗法比单独应用一种神经保护剂的治疗效果更好，如在脑缺血中，溶栓治疗和神经保护剂的联合应用可能会有更好的作用，神经保护剂的应用延长了溶栓治疗的时间窗，溶栓则增加了神经保护剂进入靶部位的机会。

国外一项调查报告显示，预计到2010年，神经保护将成为神经疾病治疗中的常规部分，而且神经保护类产品将占整个神经系统类产品市场规模的7%，这为神经药理学工作者提供了巨大的机遇。另外，随着基因组学、蛋白质组学和代谢组学等技术手段的不断发展，对神经系统疾病发病机制的认识也在逐步深入，也为发现作用于多个病理级联的多靶点神经保护剂的开发带来了希望，但目前的进展仅仅是开始，仍面临很大挑战。而今后神经保护剂的研发目标除了防止进一步损伤外，还应有一定的促进神经元修复功能。

参考文献

徐超.2006.神经保护剂研究中存在的问题和对策.中国药理学通讯,23（4）：8～9

Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V.(ALS/Riluzole Study Group)1994. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. N Engl J Med,330（9）：585～591

Levin LA, Peeples P. 2008. History of neuroprotection and rationale as a therapy for glaucoma. Am J Manag Care,14（1 Suppl）：S11～14

Reisberg B, Doody R, Stöffler A, et al.(Memantine Study Group)2003. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. N Engl J Med,348（14）：1333～1341

撰稿人：王晓良　彭　英
中国医学科学院药物研究所

抗生素的使用和耐药

Use of Antibiotics and Drug Resistance

1. 背景

抗生素（antibiotics）是生物（包括微生物、植物和动物）在其生命活动过程中产生的（或在生物产物的基础上经化学、生物或生物化学方法衍生的）、在低微浓度下能选择性地抑制或影响他种生物功能的相对低分子质量的化学物质。抗生素从发现到现在一直是临床抗感染的首选药物，在保障人类健康方面发挥了重要作用。随着抗生素的广泛使用，导致微生物逐渐对其产生耐药性（antibiotic resistance）。耐药大多发生在滥用抗生素的基础上。某种抗生素的耐药率与使用这种抗生素的频度成正比。耐药菌株可以从一个地区传播到另一个地区，从一个国家传播到另一个国家，甚至从动物传播到人。这就是国际社会关注这个问题的原因所在。虽然不断地有新一代抗生素衍生物投入使用，但也随之产生了新一代耐药菌株。耐药基因借助质粒、转座等快速传播蔓延，耐药菌株数量迅猛增加且耐药水平不断升高，极大地削弱了抗生素的有效性，对人类健康已经构成了严重威胁。有限的抗生素种类和日趋严重、复杂的耐药性已成为当今的一个世界性难题。

2. 科学意义

细菌耐药已成为一个全球性的问题，越来越多的细菌出现耐药，其耐药水平也越来越高。目前结核病死灰复燃，结核杆菌耐药的日趋严重是其原因之一；肺炎链球菌的耐药几乎使治疗此菌引起的呼吸道和中枢神经感染的第一线药物疗效尽失。由于多重耐药的发生，治疗耐甲氧苯青霉素金黄色葡萄球菌的抗生素几乎只有万古霉素一种有效，而且对万古霉素耐药的金黄色葡萄球菌也已经出现，引起世界范围内的关注。所以，需要研究抗生素的合理使用和细菌的耐药机制，从而解决日益严重的抗生素耐药问题，提供合理有效的抗生素使用方案。

3. 最新进展

目前存在的耐药菌可归为 3 类：①高致死率的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*，MRSA）和对万古霉素完全耐药的金黄色葡萄球菌（Vancomycin-resistant *S. aureus*，VRSA）；②多重耐药（multidrug-resistant，MDR）和泛耐药（pan-drug-resistant，PDR）的革兰阴性菌，如鲍曼不动杆菌（*Acinetobacter baumannii*）、大肠埃希菌（*Escherichia coli*）、

肺炎克雷伯菌（*Klebsiella pneumoniae*）和铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）。③多重耐药（MDR）和严重耐多药（extensively-drug-resistant，XDR）的结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*），即 MDR-TB 和 XDR-TB 菌株。人们对细菌耐药性机制进行了广泛深入的研究，结果表明引起细菌耐药的分子机制主要包括以下四种：①突变引起外膜孔蛋白的表达下调、缺失或结构修饰，降低了抗生素的通透性；②突变引起跨膜外排泵（efflux pump）的过度表达，使得抗生素在细菌细胞内的浓度下降，通常外排泵能够泵出几种不同的抗生素产生多重耐药性；③产生耐药酶如 β-内酰胺酶、氨基糖苷钝化酶等使抗生素失活；④通过变异、重组或其他靶位替换使抗生素靶位发生改变，造成抗生素对靶位的亲和力下降。某一耐药菌可能存在 1 种或 2 种以上的耐药机制，如铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素耐药不仅与该类菌高产头孢菌素（AmpC）酶和产金属 β-内酰胺酶（MBL）有关，也与外膜渗透性降低及对抗生素的主动泵出机制有关。耐药菌种类繁多，以及其复杂的耐药机制，给抗生素临床抗感染治疗和新抗生素的研制带来巨大困难。

4. 主要难点

面对日益严重的耐药性问题，要加强现有抗生素的合理使用，掌握使用抗生素的基本原则，在确保抗生素的临床药理作用安全有效的前提下合理使用，减少耐药性产生的机会，最终提高抗生素使用的有效性。要熟悉抗生素的抗菌谱与药理作用特点，熟悉药物的抗菌谱、作用特点，根据病情合理选用药物。根据致病菌的敏感度选药，在使用抗生素前，最好做药敏试验，根据试验结果合理选药。根据感染疾病的规律选药，根据疾病的发展规律，适当调整用药剂量或用药品种。合理联用抗生素，临床没有明确指征不宜联合应用抗生素，如系致病因未明的严重感染或混合感染等用一种抗生素不能控制的，可考虑联合用药。在选择药物时应全面考虑药物的作用特点及不良反应，做到安全、合理、有效地使用抗生素。另一方面应开发对耐药病原菌感染有效的新型抗生素。2000 年以来，只有几类新型抗生素被批准，包括▮噁烷酮类（利奈唑胺）、环脂肽类（达托霉素）和甘氨酰环素类（替加环素）。因此，研究与开发新型抗生素已迫在眉睫。

5. 展望

抗生素的产生和发展是人类历史上的一件大事，是人们对付感染性疾病的里程碑。但应看到，由于长期滥用抗生素，导致许多细菌，特别是致病菌产生了耐药性，这已经成为目前医学界的一个世界性难题。研究致病菌的耐药机制及研发出新型抗菌药物迫在眉睫。同时还必须从卫生行政部门制定药物的有关政策、加强对医务人员和公众的再教育等方面入手，合理使用抗生素、控制耐药菌的产生和扩散。

参 考 文 献

卢毅，陈祈磊. 2003. 应对抗生素耐药的新策略. 国外医药·抗生素分册，24(6)：265～268

王晓晨. 2009. 抗生素研究领域的最新进展. 国外医药·抗生素分册，30(5)：205～210

Fischbach MA，Walsh CT. 2009. Antibiotics for emerging pathogens. Science，325(5944)：1089～1093

Luzzaro F，Toniolo A. 2004. Prevalence and characterization of metallo-β-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Diagn Microbiol Infect Dis，48(2)：131～135

Mingeot-Leclercq MP，Glupczynski Y，Tulkens PM. 1999. Aminoglycosides：activity and resistance. Antimicrob Agents Chemother，43(4)：727～737

Wang J，Soisson SM. 2006. Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. Nature，441(7091)：358～361

Weber T，Welzel K，Pelzer S. 2003. Exploiting the genetic potential of polyketide producing streptomycetes. J Biotechnol，106(2～3)：221～232

撰稿人：夏焕章　韩　威

沈阳药科大学

实现个体化用药的综合数学模型

Comprehensive Mathematical Model on Personalized Medicine

药物的安全性和有效性是新药开发和临床用药的核心问题，也是药物药理学研究的主要目的。但是由于药物反应个体和群体差异的普遍存在，现状不容乐观。对于药物而言，没有任何一种药物可以确保 100% 的疗效而不发生不良反应。即使全球销售排行榜排名前 30 位的“重磅炸弹”级药物通常有效性也不过 40%～60%。统计数据表明，在绝大多数药物的使用中约 1/3 的使用者不能取得满意疗效，约 1/6 的使用者发生不同程度的不良反应，总的安全有效率仅约 50%。目前药物不良反应已经成为人类第五大死亡原因。美国每年约 10 万人死于药物不良反应，我国由于医疗卫生条件相对较差、人口基数大、抗生素滥用等问题的存在，形势更为严峻。据统计，我国每年有 500 万～1000 万人因药物不良反应入院，住院患者药物不良反应发生率为 10%～20%，因药物不良反应致死人数为 20 万人/年。药物使用的安全性和有效性已成为制约国民健康和社会发展的重要因素，也是摆在广大药物学和药理学研究者面前的重大课题。

现代医学研究表明，遗传因素是造成药物反应中个体和群体差异的主要原因之一，药物代谢、转运和效应相关基因的遗传多态性，可解释大量临床中出现的药物反应个体差异和毒副反应等问题。在过去 50 年中，遗传药理学得到了迅速发展，基因组学、蛋白质组学及纳米技术等科技的应用已实现分子诊断水平的快速升级，并且开始在新药开发和个体化治疗中广泛应用。因此，现在的问题不再是我们能否实现个体化用药，而是我们将在何时、以何种方式实现个体化用药。2003 年，美国药品食品监督管理局（FDA）颁布了《新药开发中的药物基因组资料呈递指南》，据统计，仅截至 2004 年，共有 150 余种药物或新药化合物向 FDA 呈交了药物基因组学资料。2006 年 7 月，FDA 批准了第一种分子检测（GeneSearch BLN 检测）应用于乳腺癌转移的诊断；2007 年 9 月，FDA 批准了第一种遗传分子检测，用于预测抗凝药华法林的敏感性，该检测主要用于分析 CYP2C9 和 VKORC1 的基因多态性。目前已有 30 余种药物贴上了遗传标签，标记出不同基因型患者在应用该药物时可能出现不同的疗效及毒性作用。美国的医院已经在某些领域开始尝试个体化药物治疗，例如多种抗肿瘤药物（如硫唑嘌呤、西妥昔单抗、伊利替康等）、抗精神病类药物（卡马西平等）、免疫抑制剂（他克莫司、环孢素等）、抗凝药物（华法林）等应用前已要求在患者中开展相关遗传信息检测以获得预期的疗效并避免毒副反应。

传统的基因导向型个体化用药是主要基于候选基因常见单核苷酸多态性（SNP）的相关性研究，的确发现了不少可用于指导个体化用药的遗传标志。后来，伴随基因组、蛋白质组和代谢组等组学理论与技术的极大，使得遗传药理学由研究单基因、单位点变异对药物作用的影响而转向多基因、多位点方向。近年来，高通量基因芯片技术的应用突破了技术的高墙，将遗传药理学推向高级阶段，即以药物作用通路为基础（pathway-based）的药物基因组学研究和全基因组关联分析（GWAS）时代的药物基因组学研究。

但即使是获得个体完整的基因组成信息，在15～20年之内也无法完全消除药物不良反应问题。因为非遗传因素对药物的安全性和有效性的影响也同样不能忽视，遗传因素和非遗传因素之间的交互作用使问题变得更加复杂。某些基因作为药物失效或发生不良反应的主效基因，可成为遗传药理学与个体化用药最容易实现的目标。但对于大多数药物而言，遗传变异难以解决所有药物反应中个体差异的问题，身高、体重、性别、肝肾功能、饮食、合并用药等环境变量和个人变量等可能对药物反应起更大作用，这种情况下需要综合考虑多种因素在个体化用药中的作用（图1）。因此，建立遗传-环境-个人变量的综合数学模型，实现药物作用的定量评估，对于未来的个体化治疗具有重要意义。

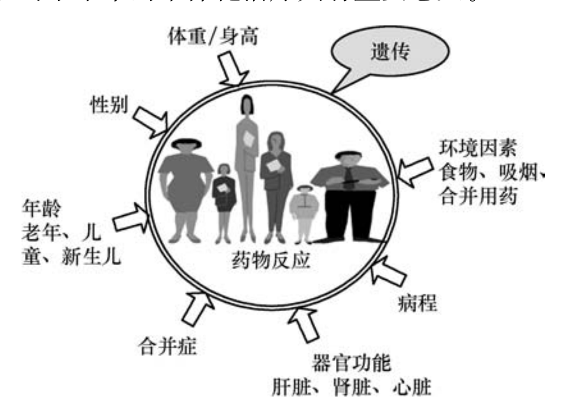


图1　常见的决定药物反应的因素

在一项涉及上千名受试者的研究中，研究者首次尝试将影响华法林治疗剂量的多个遗传和非遗传因子的作用进行量化，将各种影响因素和华法林剂量之间的关系整理为以下公式：华法林每日剂量＝0.9751－（0.3238×VKORC1 3673G>A）＋（0.4317×人体表面积）－（0.4008×CYP2C9*3）－（0.2066 × CYP2C9*2）＋（0.2029×国际标准化比率的目标值）－（0.00745×年龄）－（0.2538×胺碘酮）＋0.0922×吸烟 －（0.0901×非洲裔种族）＋（0.0664×深静脉血栓/肺栓塞），并以此为基础创建了一个非营利的软件和网站（http：//www．WarfarinDosing.org），供临床工作者免费使用。该项成果虽然不能完全解释华法林剂量的影响因素，仍具有

划时代的意义，它第一次结合遗传和非遗传多种因素调整药物剂量，并以综合数学模型的形式将华法林个体化用药推向临床应用。

迄今为止，只有华法林这一种药物实现了个体化用药综合数学模型的建立，距离实现作为临床常规指导各大疾病的个体化用药还有相当远的距离。综合而言，该目标的实现面临不少困难：首先，缺乏大样本临床循证医学的证据支持，任何一个遗传或非遗传因素对药物的作用都需大样本临床数据的支持，需要大量人力、时间和资金的投入；其次，遗传因素的挖掘永无止境，新的基因及其位点对于药物安全性和有效性的作用被不断发现，尤其是进入GWAS阶段之后，某些看似毫不相干的基因被发现显著影响药物反应；此外，关于药物代谢酶的研究已成药物基因组学和遗传药理学发展史上的经典案例，但如受体分子、离子通道分子、细胞黏附分子、信号转导通路分子、伴侣蛋白、核酸和DNA修复系统、翻译后加工分子、细胞周期与生长因子、转录因子等的作用还没有完全明了，这些相关基因功能的组合和交互作用将决定患者对某种药物是“敏感型”或“耐受型”；再次，种族差异的普遍存在使得某些遗传因素在某一种族中可影响药物的反应，而在另一种族中该相关性却不一定存在，因此使得建立多种族通用模型变得更为困难；最后，各种药物的模型各不相同，不同种类药物甚至同种药物之间的影响因素各不相同，使得每一种药物都必须建立独立模型，统一的个体化用药综合数学模型并不存在。

无论如何，个体化用药是未来医药模式发展的必然趋势，个体化用药的综合数学模型将在未来50年内在某种程度或形式上慢慢成为现实，并指导广大患者的药物治疗。

参考文献

Innocenti F, Ratain MJ. 2006. Pharmacogenetics of irinotecan: clinical perspectives on the utility of genotyping. Pharmacogenomics, 7 (8): 1211～1221

International Warfarin Pharmacogenetics Consortium, Klein TE, Altman RB, et al. 2009. Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. N Engl J Med, 360 (8): 753～764

Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. 1998. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. JAMA, 279 (15): 1200～1205

Little S. 2005. The impact of FDA guidance on pharmacogenomic data submissions on drug development. IDrugs, 8 (8): 648～650

Stanulla M, Schaeffeler E, Flohr T, et al. 2005. Thiopurine methyltransferase (TPMT) genotype and early treatment response to mercaptopurine in childhood acute lymphoblastic leukemia. JAMA, 293 (12): 1485～1489

撰稿人：周宏灏　张　伟

中南大学

药物传递系统与使用

Administration Route and Employing of Drug Delivery System

口服药物传递系统是全身作用药物最理想的给药途径，一方面易被患者接受，另一方面制造成本低，因此在新药和制剂的研发中作为首选给药途径。口服药物传递系统的最大问题就是药物生物利用度低且不稳定，其主要原因是药物水溶性差、溶出速率慢、胃肠道吸收差且在胃肠道环境下不稳定、肝脏首过代谢和胃肠转运变异性大及 P-糖蛋白介导的外排等。控制好这些因素是改善口服给药的重要手段，需要对药物的物理化学原理、胃肠道生理学和生物化学、聚合物学、药物动力学和药效学等学科的知识有透彻的理解并进行合理的整合。对于口服药物的生物利用度低且不稳定问题，除了通过改变药物自身性质外，主要通过药物制剂加以解决。目前上市的口服药物传递系统主要包括速释制剂、缓控释制剂和定位释放制剂。速释制剂目标是使药物快速起效，涉及使用泡腾混合物的快速崩解片剂和颗粒剂，使用强崩解剂及应用纳米技术等。缓控释制剂是使血药浓度维持在最低有效水平而持续时间延长，从而减少用药次数，口服给药控释技术有扩散控制系统、溶剂活化系统和化学控制系统。定位口服给药要求给药装置空间定位于消化道的某个部位，包括胃内滞留系统、黏膜黏附系统、肠溶包衣系统和结肠定位系统。可以预料，目前的发展趋势是口服给药系统将为治疗药物，特别是生物技术药物输送带来巨大的革命，但肽类和蛋白质口服给药的成功仍然是一项艰巨的挑战。

狭义的靶向制剂是指通过注射途径，利用血液循环，将药物选择性递送至靶组织、靶器官、靶细胞（包括细胞内结构）或靶分子的给药系统。与常规注射剂相比，靶向制剂可以提高药物疗效，降低毒副作用，增加用药的安全性、有效性和可靠性。制剂学意义上的靶向制剂，主要是指通过载体来提高病变部位的药物量，包括浓度与一定浓度的药物在这些靶部位滞留时间。目前较为成功的靶向制剂产品有 PEG 包衣的多柔比星脂质体，虽然可以在一定程度上提高肿瘤组织中的药物量，延长药物在肿瘤组织中的时间，但仍然存在靶向的针对性不强、靶部位的利用度不高等问题。未来的发展方向就是要解决这类问题，即提高靶向的针对性与靶部位利用度，进一步提高疗效，减少毒副作用。目前的措施是利用配体、抗体来主动识别靶点——主动靶向制剂，如血管靶向多柔比星脂质体、转铁蛋白靶向奥沙利铂脂质体等。

近40年来，经皮药物传递系统得到了空前的发展。但皮肤是人体的天然屏障，阻碍药物进入体内，大多数药物，即使是剂量低、疗效高的一些药物，透皮速率也难以满足治疗需要。如何保证足够量的药物透过皮肤进入体内达到治疗剂量，是经皮给药系统研究的重点。原有的透皮药物只是小分子且剂量小，促进方法也只限于化学促透剂和离子导入。目前解决的策略涉及：①基于作用机制的高促渗透、低刺激性的经皮吸收促进剂筛查。②经皮离子导入给药法。目前，分子质量小于4kDa的蛋白质（如降钙素等）已成功导入动物体内并产生了药效。③经皮超声导入给药法，该方法不限于电离和水溶性药物，其通透药深度更深，药物不会被电解破坏，不存在极化问题，更适合于生物大分子药物。低频超声波改变皮肤的屏障作用，需要关注两个重要的安全问题——效果的可逆性及对组织损伤的经受能力。④微针给药法具有注射器加透皮贴剂的双重优点，适用于液态和治疗剂量要求更大的药物，尤其适合生物大分子药物。但微针给药法也存在不足，如给药剂量的限制，某些药物引起的副作用，疫苗接种时皮肤本身的免疫激发性所产生的免疫应答有可能使某些常规药物失效等。

许多眼部疾病，如白内障、青光眼、感染性炎症、视网膜病变等，如果得不到及时有效的治疗甚至会导致失明。经眼给药是治疗这些眼部疾病的重要途径之一，但随着生物药剂学与药物动力学的深入研究发现：①由于眼角膜屏障、泪液的稀释和泪道的引流等原因，常规眼部给药的生物利用度较低（仅为1%～10%），即使反复使用也难达到持效的目的；②对于眼后段的视网膜玻璃体疾病，血-视网膜屏障和视网膜-脉络膜屏障作用的存在，药物难以穿透到达眼后段，即便是结膜下给药疗效也欠佳，缺乏有效作用于眼后段的局部药物给药系统。因此，眼部给药系统需要考虑：延长药物在眼表滞留时间；增强药物于眼角膜的通透性；提高药物靶向性并降低药物不良反应；促进药物的眼部吸收以提高生物利用度。眼部用药的新型载体，如脂质体、微球、纳米粒和微乳等胶体分散系统，与传统眼部给药剂型相比已显示其独特的优势。

参考文献

Ashim K Mitra. 2003. Ophthamic Drug Delivery Systems. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc

Eric W Smith, Howard I Maibach. 2006. Percutaneous Penetration Enhancers. 2nd ed. New York: Taylor & Francis

Francis GE, Cristina Delgado. 2000. Drug Targeting Strategies, Principles, and Applications. Totowa: Humana Press

James Swarbrik, James C Boylan. 2002. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc

Michael J, Rathbone, Jonathan Hadgraft, et al. 2003. Modified-Release Drug Delivery Technology. New York: Marcel Dekker Inc

Qiu Yihong, Chen Yisheng, Zhang Geoff GZ. 2009. Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory & Practice. New York: Elsevier Inc

Rai VA, Ghosh IB, Bose S, et al. 2010. A transdermal review on permeation of drug formulations, modifier compounds and delivery methods. J Drug Deliv Sci Tech, 20(2): 75～87

Rizwan M, Aqil M, Talegaonkar S, et al. 2009. Enhanced transdermal drug delivery techniques: an extensive review of patents. Recent Pat Drug Deliv Formul, 3(2): 105～124

撰稿人：方　亮　王思玲　潘卫三

沈阳药科大学

代谢组学：药物安全性评价的新方法

Metabolomics: An Approach to the Evaluation of Drug Safety

药物虽然对疾病具有治疗效果，但往往还存在一定的毒性。为了保证患者用药的安全性，所有药物在正式用于临床治疗前必须进行严格的安全性评价，即毒性试验和评价。大多数安全性/毒性评价方法偏重于定性评价，而为了使药物的使用更加安全可靠，还需要定量评价药物的毒性，为确定给药剂量和制定给药方案、设定安全剂量范围提供数据。在新药研发早期，药物安全性/毒性评价方法分为一般毒性试验（急性毒性试验和慢性毒性试验）和特殊毒性试验（致突变、致癌、致畸试验）。经典的急性毒性试验是毒理学实验的基础，用于评价药物对机体的急性毒性大小、毒性效应的特征和剂量-反应关系。试验一般使用两种哺乳动物（啮齿类和非啮齿类），以半数致死剂量（LD_{50}，即动物死亡50%所需的药物剂量）为指标，根据LD_{50}值来进行急性毒性分级，可粗略地表示受试药物对动物急性毒性的强弱和对人体潜在的危害程度；慢性毒性试验是在急性毒性试验所获资料的基础上，进一步评价和评估受试药物在重复给药情况下的毒性特征，为进一步进行其他毒性试验和评估人用安全范围提供资料。其测定指标包括：器官重量变化、血液学参数（白细胞分类计数、血红蛋白含量、血细胞比容、凝血时间、血小板和网织红细胞计数）、血液生化指标、病理学检查（评价受试药物对试验动物器官组织的形态和结构的影响）。无害作用剂量（NOAEL）和最小有害作用剂量（LOAEL，用于提出安全限量参考值）是定量评价药物毒性的两个指标，NOAEL和LOAEL值越小，说明慢性中毒的危险性越大。与一般毒性定量评价方法类似，特殊毒性的评价方法也选用一些量化指标来评价药物毒性。例如，目前检测基因突变最常用的方法——Ames试验，利用药物作用下回复突变的菌落数为指标，从而估算药物致突变性的强弱。而致癌试验一般观察2个指标，即肿瘤发生率与潜伏期，可计算得致癌指数如下：

$$致癌指数=\frac{肿瘤发生率（\%）}{平均潜伏期（天）}\times 100\%$$

利用致癌指数可对药物的致癌毒性进行比较。致畸试验则是通过统计处理各项数据（孕鼠重、黄体数、死胎数、活胎数、活胎重、性别、外观异常等），最后综合判定药物的胚胎毒性和致畸可能。

进入临床前研究的药物安全性/毒性评价无一例外地采用动物进行试验，通

常采用与人相同的给药方式，观察给药后动物行为表现、生化参数、生理变化、死亡率、组织/器官的损害等。由于常规人体给药剂量下，药物的毒副作用往往很小，上述毒性指标难以观察，为了方便这些指标的观察，给予动物的药物剂量一般远高于人体给药剂量（常按每公斤体重计）。然而，高剂量给药方式不仅消耗大量药物，还大大地增加了新药研发成本；不仅对实验动物造成很大伤害，还需要更多动物进行实验。从药物安全性/毒性评价的初衷上看，其本质是为了减少药物对人/动物的伤害，使用药更加安全，而为了实现这个善良的目的却采用了与目标完全背道而驰的、不安全的方法，并给实验动物造成了伤害甚至死亡，这不能不说是一个巨大的讽刺。另一方面，上述动物行为表现、组织/器官的损害等毒性评价指标：①需要人为判断，难以精确地量化，存在一定的主观性和不确定性；②只反映了毒性的外在表现，没有体现机体内在本质的变化。因此，建立方便、灵敏、节约、对动物伤害小的新的药物毒性评价方法具有重要意义。

众所周知，机体内源性小分子物质组是生命活动和细胞赖以生存的基础，机体的功能状态必然反映在体内代谢组（内源性小分子化合物总称）上。大量研究表明，在中毒状态下，生物体的生化代谢和其中很多小分子化合物水平出现明显异常。毒性越强，对生物体各项功能的影响也越大，机体的各项功能状态/体内小分子水平也越偏离正常状态；而毒性越弱，对生物体各项功能的影响也越小，机体的各项功能状态/体内小分子水平也较少程度上偏离正常状态。而在毒性随时间的变化过程中，随着毒性的减弱，机体的各项功能逐渐恢复，体内小分子和代谢水平也逐渐得到恢复。因此，对体内小分子进行定量检测可能为药物毒性的评价提供基础数据。

作为体内物质基础的小分子化合物种类繁多、性质千差万别，如何对这些化合物进行全面、定量测定一直是困扰科学界的难题。近年来新兴的代谢组学（metabolomics 或 metabonomics）为解决这个问题提供了一个理想的方法。代谢组学的研究对象是“代谢组”（metabolome），即生物样本、系统、组织或细胞中小分子化合物的总称。这些化合物包括氨基酸、脂肪酸、脂类、小分子有机酸、核苷、嘌呤化合物、氨类化合物、糖醇类化合物、神经递质等，它们既是生命活动必需的原料，也是机体代谢的终产物或中间体，还是机体生长、发育、生物信号转导和代谢循环的重要物质基础。代谢组学就是借助适当的工具检测内源性小分子化合物，通过测定体内小分子化合物水平的变化研究各种因素对代谢组的影响，为药物毒性的定量评价提供基础数据。另一方面，由于代谢组学研究的分子与生命活动中起着极为重要作用的糖代谢、脂代谢、三羧酸循环、尿素循环、氨基酸循环等密切相关，因此代谢组学也可能在研究药物毒性分子作用机制方面发挥重要作用。

近年来，采用代谢组学技术研究和评价药物毒性十分活跃，并涌现出大量文献。通过分析给药动物生物样品的代谢谱并与正常动物的代谢谱对比，可发现并鉴定出现异常变化的分子，通过研究和分析与毒性、生化代谢相关的小分子可能

确定药物毒性的潜在生物标志物。通常情况下，生物标志物水平与毒性强弱密切相关，因此定量检测毒性生物标志物的水平有望为毒性评价提供一个定量指标。例如，在研究雷公藤甲素对大鼠的毒性时发现大鼠的常规血液学和生化指标如谷丙转氨酶、谷草转氨酶、白细胞数、肝（切片）毒性等与剂量呈明显正相关，而与给药后的时间呈现负相关。利用基于气相色谱飞行时间质谱测定发现雷公藤甲素给药组大鼠血清代谢谱与对照组存在明显差异（图 1），鉴定出与毒性相关的化合物有氨基酸、游离脂肪酸、三羧酸循环中间产物等，且与上述变化趋势相关。作为肝脏毒性的特征生物标志物，牛磺酸水平的升高与转氨酶升高相吻合，而多种氨基酸水平的上升与肝细胞转氨基受阻有关，这些均提示肝功能受损；升高的游离脂肪酸和下降的脂肪酸代谢物 3-羟基丁酸说明脂肪酸 β-氧化受阻，另外发现马尿酸水平下降，提示乙酰辅酶 A 活力降低是脂肪酸 β-氧化受阻原因。而整体下降的三羧酸循环中间产物提示线粒体的呼吸功能受到影响。因此，提示雷公藤甲素毒性主要表现在对线粒体能量代谢（三羧酸循环、脂代谢）、肝细胞的转氨基作用（氨基酸代谢）的异常。有趣的是，鸟氨酸和吲哚丙酸等指标也随剂量和时间变化而出现对应的变化，并且与常规生化指标呈现一定的相关性。

值得重视的是，代谢组学方法可以更灵敏地反映药物的毒性。上述研究中，给予低剂量雷公藤甲素时，常规生化指标和组织切片均没有发现异常。然而，不仅代谢组学的分布散点图（图 1）显示低剂量给药后样品偏离正常，而且体内一

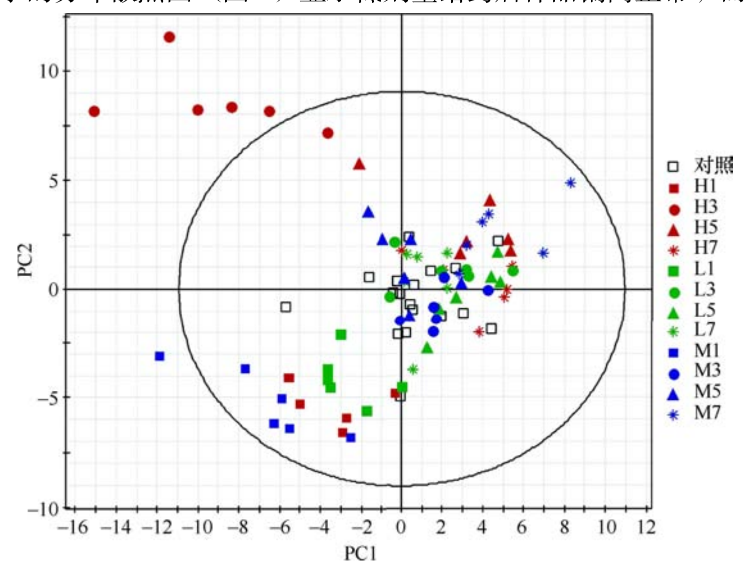


图 1　雷公藤甲素给药后引起 SD 大鼠血清代谢谱出现不同程度的变化，并呈现出剂量和时间依赖性

L. 低剂量；M. 中剂量；H. 高剂量；0、1、3、5、7. 给药前（对照）或给药后 1、3、5、7 天

些分子水平也出现异常，均明确提示了毒性的产生，说明代谢组学方法可以更加灵敏地检测毒性的发生，为实现和建立灵敏、安全的药物毒性评价方法提供了现实的可能性。由于灵敏度大大提高，毒性研究往往需要更少的药物剂量，不仅节约了药物用量，还减少了对动物的伤害。另一方面，由于代谢组学检测的样品可以采用血浆或尿液，与常规毒性评价中的组织/器官的活检/切片需要处死大量动物相比，需要的动物数量也大为减少，而且减少了对动物的伤害。这种方法兼有方便、直接、快速、便于连续取样的特点，可以即时反映机体的动态信息，是药物毒性评价较有前途的一个方法。

参考文献

楼宜嘉,朱依谆,刘铮,等.2007. 药物毒理学. 第2版. 北京:人民卫生出版社

王心如,石年,孙志伟,等.2004. 毒理学基础. 第4版. 北京:人民卫生出版社

周立国,向明,季晖,等.2009. 药物毒理学. 第2版. 北京:中国医药科技出版社

Aa J, Shao F, Wang G, et al. 2010. Gas chromatography time-of-flight mass spectrometry based metabolomic approach to evaluating toxicity of triptolide. Metabolomics, DOI 10.1007/s11306-010-0241-8

Keun HC. 2006. Metabonomic modeling of drug toxicity. Pharmacol Ther,109: 92～106

Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E, et al. 2003. Contemporary issues in toxicology the role of metabonomics in toxicology and its evaluation by the COMET project. Toxicol Appl Pharmacol,187 (3): 137～146

Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, et al. 2002. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. Nat Rev Drug Discov,1: 153～161

Robertson DG. 2005. Metabonomics in toxicology: a review. Toxicol Sci,85: 809～822

撰稿人:阿基业　王广基

中国药科大学

中西药合用与安全性

Combinatory Use of Herb and Drug and Its Safety Concerns

近年来，随着人们对于单个成分、单靶点化学药物在慢性、疑难疾病治疗中局限性的认识不断深入，多成分中药的整体疗效的优势受到了愈加广泛的重视，中西药联合使用已经越来越多地被临床医生和患者所接受。虽然中西药合用有望针对疾病发生发展的多个病理环节进行同步干预，从而发挥“标本并治”的疗效优势，但由于目前中西药联用缺乏科学的指导和必要的临床监管，时有中西药合用产生不良反应的报道，中西药合用引发的不良反应已经成为国际范围内关注的热点。从基础入手，深入研究和了解中西药联用产生不良反应的内在本质，掌握其中规律，才能制定科学、合理的中西药联用标准与法则，充分发挥有益的中西药互补作用，提高临床疗效，同时避免中西药联用时出现的不利相互作用，降低不良反应的发生率。

从中西药联用产生毒副作用的本质分类，可将中西药合用产生的不良反应分为以下几类：

1. 基于药效学作用产生的不良反应

某些中药和西药在药理效应上类似，配伍使用时，药理作用加强，导致不良反应。如麻黄、颠茄、洋金花等中药具有兴奋心肌作用，与洋地黄、地高辛等强心药配伍合用可导致心率加快，增加强心药对心脏的毒性；麻黄、枳实有类似肾上腺素作用，与肾上腺素同用，可增加后者的毒副作用；异烟肼和麻黄碱均有兴奋中枢的副作用，两药同用可使不良反应增加；雷公藤与氯霉素同时使用时，因两者都能抑制骨髓造血功能，可引起血小板减少性紫癜、粒细胞减少，加大再生障碍性贫血的风险；桃仁、杏仁、银杏等含氰苷成分的中药，同麻醉、镇静止咳等西药联用，易引起呼吸中枢抑制，甚至死于呼吸衰竭；甘草皂苷水解后生成甘草次酸，其结构和功能类似肾上腺皮质激素，与水杨酸衍生物长期合用，增加对胃黏膜的刺激，可使胃溃疡发生率增加；洋金花里含有阿托品成分，与阿托品合用，若控制不当会出现中毒症状。由此可见，当中药中含有的成分与西药具有相同药理/药效作用时，合用可能使药效作用相加而超出人体耐受范围，导致不良反应或毒副作用的发生。

2. 基于药代动力学影响产生的不良反应

理论上说，在药物吸收、分布、代谢与排泄几个环节均可能发生相互作用，

从而改变联用药物的体内动力学特征。例如胃肠道酸碱度的变化可改变药物的非解离型的比例或改变药物的溶解速度，如碱性中成药大黄苏打片与弱酸性药物阿司匹林合用，因碱性能增加阿司匹林的溶解速率，促进胃排空和肠吸收，使其吸收加快，起效迅速；通过影响胃肠蠕动和排空速率的改变而改变吸收，如中成药华山参片具有抗胆碱作用，能抑制肠道蠕动，可增加其他药物如地高辛在肠内停留时间而有利于吸收；配伍使用生成络合物或沉淀而减少吸收，具体指含钙、镁、铝等二价以上金属离子的药物与四环素类抗生素形成金属络合物，含鞣酸药物与四环素类形成鞣酸盐沉淀物，使吸收减少，疗效降低。

在药物分布环节，中西药配伍联用时有多种因素可能改变药物分布。例如碱性中药硼砂与西药链霉素、庆大霉素等同服时，能使这些抗生素排泄减少，增加脑组织中药物的分布/浓度，在药效增强的同时耳毒性增强，形成暂时性或永久性的耳聋。蛋白结合率是另一个影响药物分布的重要因素，也是产生药物相互作用和不良反应的重要过程，例如丹参与抗凝药华法林合用时，由于华法林血浆蛋白结合率高，丹参成分通过血浆蛋白结合竞争，使得血浆中游离华法林浓度上升，从而导致过度抗凝和出血。

药物的代谢过程是产生药物相互作用的重要环节，也是中西药合用出现安全问题的主要环节。肝微粒体酶是混合功能氧化酶系统，专一性较低，而且活性易受某些中西药的影响，从而影响药物的代谢、作用时间和强度。例如，通过抑制肝药酶活性使某种药物的体内浓度偏高从而产生毒副作用。当中药或植物药中的成分可以抑制 CYP 家族中的主要代谢酶，而西药中的化合物通过该酶代谢时，就可能因代谢相互作用而产生毒性。最著名的例子如柚子汁对 CYP3A4 酶有较强的抑制作用，可以显著升高经过 CYP3A4 酶代谢的药物浓度，如酮康唑、非洛地平、环孢素等。另有研究表明白芷、丁香、黄连、吴茱萸等能抑制肝微粒体中 CYP2D6 的活性，因此对经过 CYP2D6 酶代谢的药物可能造成代谢减少、血药浓度升高的现象，而经过 CYP2D6 代谢的药物多是治疗心脑血管疾病类药物(如奎尼丁、阿米替林、普萘洛尔、美托洛尔、去甲替林等)，因此此类中西药合用必须特别谨慎。又如中药复方补肾方汤剂能抑制小鼠肝药酶而减缓戊巴比妥的代谢，明显地延长小鼠的睡眠时间。又如含麻黄的中成药如大活络丸、人参再造丸、气管炎糖浆、半夏露冲剂等，与西药呋喃唑酮（痢特灵）、异烟肼等单胺氧化酶抑制剂合用，因单胺氧化酶抑制剂可抑制人体内的单胺氧化酶，使单胺类神经递质如去甲肾上腺素、5-羟色胺、多巴胺等不被破坏，而贮存于神经末梢内。当服用含麻黄的中药时，麻黄中的麻黄碱不被破坏，随血液循环至全身组织，促使单胺类神经递质大量释放，可引起恶心、呕吐、腹痛、头痛、呼吸困难、运动失调，严重时可出现高血压危象和脑出血。

中药通过诱导肝药酶活性使经过相同酶代谢的药物代谢加快，当代谢产物没

有药理活性时，可能导致治疗失败。如圣约翰草提取物对CYP3A4具有诱导作用，而印地那韦主要通过CYP3A4代谢，在连续给予圣约翰草后再给予印地那韦，发现印地那韦的血药浓度-时间曲线下峰面积比未给圣约翰草的对照组降低了85.4%。五味子木脂素提取物长期给药对CYP3A4具有一定的诱导作用，咪达唑仑主要通过CYP3A4代谢，预先连续14天给予五味子木脂素提取物后发现咪达唑仑的血药浓度-时间曲线下峰面积降低了近1/3（图1），提示五味子长期用药后可能会降低口服CYP3A4底物类药物的药效。当代谢产物具有毒性时，可能增加毒性或出现不良反应，比如中药生甘草以及含乙醇的中药制剂如国公酒、骨刺消痛液等是肝药酶诱导剂，这些起肝药酶诱导作用的中药若与三环类抗抑郁药（如去甲丙米嗪、阿米替林、多塞平等）同用，可使其代谢产物增加，从而诱发或增强其不良反应。

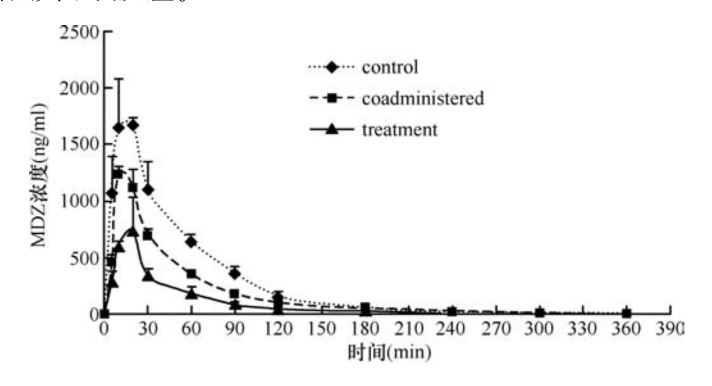


图1　单用或合并使用五味子木脂素提取物时咪达唑仑浓度-时间曲线

control，单用咪达唑仑的药物浓度-时间曲线；coadministered，五味子木脂素提取物连续给药14天，末次给药同时给予咪达唑仑的药物浓度-时间曲线；treatment，五味子木脂素提取物连续给药14天，末次给药后间隔24小时给予咪达唑仑的药物浓度-时间曲线

影响药物的排泄也可能产生不良反应。例如，弱酸或弱碱性的西药以解离或非解离型存在于肾小管滤液中，非解离型的脂溶性高，从而容易透过肾小管上皮细胞膜的类脂质层而被重吸收，排泄较慢。解离型则不易被重吸收，排泄较快。中药及其制剂影响西药解离最常见的是酸化或碱化体液。酸性中药乌梅、女贞子、五味子、山茱萸、山楂等，可酸化尿液，与碱性西药如碳酸氢钠、氢氧化铝、碳酸钙、氨茶碱、氨基糖苷类抗生素、TMP、生物碱等合用时，因形成解离型的离子而减少再吸收，促进有效成分的尽快排泄，使中西药物均失去一定疗效。上述含有酸性成分的中药及中成药，则可增强呋喃妥因、利福平、吲哚美辛等酸性药物在肾脏的重吸收，产生肾毒性。含有机酸的中药与磺胺类药物同用，可导致其在尿中结晶，引起血尿或尿闭等不良反应。

3. 基于联用药物发生的化学反应产生的不良反应

在中西药联用时还要注意化合物之间产生的可能的化学反应，如酸碱中和反应、氧化还原反应及中药中可能含有的金属离子与西药形成不溶性物质，这些化学反应既可能导致药物失效、也可能导致毒性作用。如中药硃砂（含汞）或含硃砂的中成药（如朱砂安神丸、六神丸、七厘散、紫雪丹、苏合香、冠心苏合丸等）不能与具有还原性的西药（如溴化钾、溴化钠、碘化钾、碘化钠、硫酸亚铁、亚硝酸盐类药物等）合用，因二者相互作用可发生还原反应而生成溴化汞、碘化汞和硫化汞等有毒的物质，引起较严重的汞中毒。

尽管目前对中西药合用的相互作用和安全性研究已经有了一定的进展，但由于中药成分复杂，许多中药的化学成分和其药效作用研究还处于空白状态，加上中药复方效应物质的多样性和不确定性、体内外效应物质的不一致性、药效作用的多靶点与配伍规律的复杂性、中药对药物代谢酶与转运体调控的复杂性等难题，使得人们全面预测潜在的药物相互作用和评价中西药伍用的安全性存在极大的困难。为了尽可能提高中西药合用的有效性和安全性、减少毒副作用的发生，需要我们以现有的知识为基础，注重从中药（总提物或单体成分）与西药成分的药理/药效、吸收、分布（蛋白结合）、代谢（酶）等方面去研究它们的相互作用、总结规律，为临床提供参考和建议。另外，为了全面提高中西药伍用的有效性和安全性，根本上要从中药中含有的化学成分入手，采用现代手段和先进的仪器（如LC-MS/MS、IT-TOF-MS、Q-TOF-MS等）对中药复杂成分进行全面分析，并对化合物的药效和药动学性质进行深入研究，建立数据库，为中药和西药配伍使用的科学性和合理性提供可靠的基础和保障。

参考文献

Bressler R. 2006. Grapefruit juice and drug interactions. Exploring mechanisms of this interaction and potential toxicity for certain drugs. Geriatrics ,61 (11)：12～18

Hare JT , Elliott DP. 2003. Grapefruit juice and potential drug interactions. Consult Pharm , 18(5)：466～472

Piscitelli. 2000. Indinavir concentrations and St. John's wort. Lancet ,355：547～548

Yunn-Fang Hoa. 2009. Effects of St. John's wort extract on indinavir pharmacokinetics in rats : differentiation of intestinal and hepatic impacts. Life Sciences ,85 (7～8)：296～302

撰稿人：郝海平　谢　媛　王广基
中国药科大学

血脑屏障——影响药物进入神经系统的障碍

Blood-Brain Barrier：A Bottle Neck for Drugs to Enter Central Nervous System

中枢神经系统（central nervous system，CNS）疾病，如阿尔茨海默病、帕金森病、脑癌、脑卒中等，在人群中的发病率日益增高，并变得越来越常见。据预测，到 2020 年，全球年龄大于 65 岁的人口数量将增加一倍，而患有 CNS 疾病的人数则随着人口老龄化的加剧而逐年增加，每 3 个人中至少会有 1 人在其一生中患有 CNS 疾病。当今各大制药公司纷纷投入了大量的资金和人力针对 CNS 疾病进行新药研发，寻找治疗 CNS 疾病更有效的方法。虽然在药物研发早期发现许多有前途的候选药物，但在随后的体内试验时发现一个共同的难题：药物难以进入脑组织发挥治疗作用，而影响药物进入 CNS 内的主要障碍就是血脑屏障（blood-brain barrier，BBB）。

BBB 是位于血液和脑之间的一道生理性屏障，主要由沿着大脑微血管的内皮细胞和一些外围结构（如基底膜、星形胶质细胞足突等）构成（图 1）。BBB 的存在具有非常重要的生理意义，就像保卫 CNS 的哨兵，由于连接紧密，除了一些必需的营养物质及脂溶性小分子可以透过外，其他大部分可能“有害于”脑组织的物质都被严格限制通过。BBB 的生理功能就是阻止来源不明的外源性异物进入神经系统从而起到保护作用。大分子药物，如多肽、重组蛋白、单克隆抗体、基于 RNA 干扰技术的药物、基因治疗相关药物等都无法穿越 BBB，而且绝大部分（估计 98%）的小分子药物也无法穿过 BBB。因此，BBB 在保护神经系统的同时也给治疗 CNS 疾病药物进入脑组织带来了巨大的困难。

另一方面，除了 BBB 致密的上皮细胞作为“物理性”机械屏障可阻止绝大部分外源性物质进入外，组成 BBB 的细胞中还含有一些“聪明的”转运蛋白，可以将大脑所需要的营养性物质“主动”搬运进入脑组织，满足神经系统活动的物质和能量需求。如 BBB 细胞上含有葡萄糖转运体，可以从神经系统外把血中葡萄糖转运入脑组织。而对于异物或者有害物质，BBB 细胞上还存在一类转运蛋白可选择性地将已经进入的物质从脑组织中排出，从而防止外源性物质对大脑的毒害，保持脑的内环境稳定，使中枢神经系统能正常、有效地工作。例如，一种叫 P 糖蛋白的转运体，可以将已经进入脑组织的多柔比星（治疗脑部肿瘤）主动转运排出，造成脑内药物浓度降低。

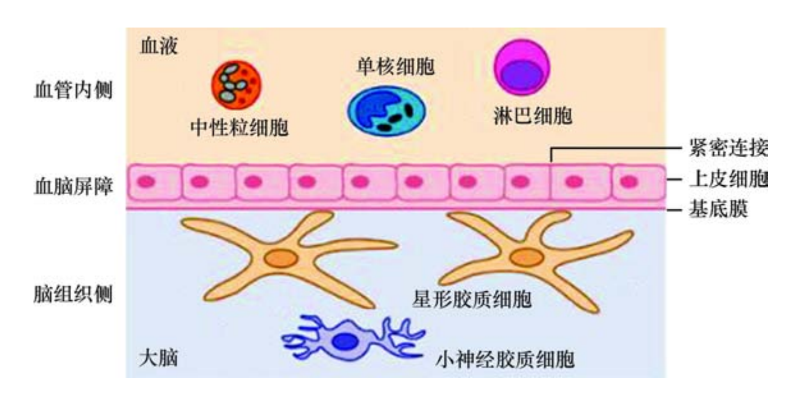


图 1　血脑屏障结构示意图

综上所述，BBB 影响和阻碍药物进入神经系统的方式归纳起来主要有两种：一种是 BBB 物理性的阻挡；另一种是对药物的选择性外排。而有利于药物进入的因素也有两种：一种是增加药物的脂溶性；另一种是利用转运蛋白将药物搬运入脑组织。为此，科学家们针对上述问题尝试了多种方法以减少 BBB 对药物阻碍和选择性外排、增加药物向脑内转运和通过 BBB 能力。

1. 增加药物的脂溶性

外周血液循环中的物质要进入脑组织，一般通过被动转运或者主动转运两种途径。被动转运即自由扩散，依赖于分子本身的物理特性及膜两侧的物质浓度；主动转运则由 BBB 上的载体或转运蛋白介导。由于 BBB 由致密的上皮细胞所组成，药物的脂溶性在很大程度上决定着药物透过 BBB 的能力，如果没有转运蛋白的帮助，脂溶性不佳的药物极少能透过 BBB。从目前的数据看，绝大多数在脑组织中有较高分布比例的药物具有较大的脂溶性，而脂溶性差的药物在脑组织中分布均十分稀少。因此，在过去的研究中，人们一直把提高药物的脂溶性和 BBB 的通透性作为主要研究方向，并提出化学转运系统（chemical delivery system，CDS）的概念，通过增强脂溶性以增加一些药物进入脑组织。比如针对含有极性基团（如羟基、羧基）、脂溶性差的药物进行酯化，将不容易透过 BBB 的极性较大药物转化为极性小的可以穿过 BBB 的脂溶性药物，进入脑组织后被代谢成亲水性结构，从而能较长时间地保留在脑内。这种方法确实增加了吗啡结构改造物进入脑组织的比例（乙酰化成海洛因后提高了进入脑组织的比例），而且能提高许多前体药物口服吸收进入体内的分数，提示通过改造药物结构、增强药物脂溶性可能使更多的药物进入脑内发挥作用。

2. 物理或制剂的方法提高药物通过 BBB 的能力

针对 BBB 的物理性屏障，研究人员还尝试了物理方法减弱或消除该屏障的方法。例如临床上曾经采用脑内插管、脑部植入、脑室注射等神经外科学方法，

但副作用大、易造成颅内感染、不利于较长时间用药。使用高渗透压溶液（20%～50%葡萄糖、20%甘露醇等）可使 BBB 短暂可逆性开放，方便药物透过 BBB 入脑。这种方法的问题是与此同时一些血浆蛋白也浸入脑，会对星形胶质细胞产生毒性，引发脑内血管和慢性神经病理学变化。如何找到一个既能增加药物进入、又不引起不良作用的方法十分困难，虽然科研工作者进行了很多的实验和研究，但至今一直没有突破性进展。研究发现，冰片等芳香开窍剂也可以提高血脑屏障的通透性，例如使用冰片可明显增加磺胺嘧啶在大鼠脑内的浓度。另外，还可以考虑采用制剂技术突破 BBB 障碍，例如纳米粒子主要由脂类或多聚体分子等高分子物质组成的固态胶体粒子，粒径为 1～500nm，由于粒子极小、性质特殊，可以穿透生物膜，有利于药物进入脑组织，利用纳米载药系统将药物粒子也装载于该靶向系统中，实现药物向神经系统定向释放，但纳米粒子的脑靶向研究在制剂技术、药物释放速度、安全性等方面还有不少需要解决的问题。

3. 借助转运体增加药物向脑内转运的方法

内源性物质向神经系统的转运依赖于血脑屏障腔面上的载体和受体，如葡萄糖运载体 GLUT、氨基酸运载体 LAT、胰岛素受体等，正常生理状态下它们行使转运葡萄糖、氨基酸、胰岛素等一些内源性分子的功能。如果将药物以容易水解的酯键、酰胺或糖苷键连接上氨基酸、葡萄糖后就能被转运蛋白所识别，并通过主动转运将药物带入神经系统，进入神经系统后在水解酶作用下水解，释放药物而发挥中枢神经系统治疗作用。如抗癫痫药物加巴喷丁（Gabapentin）和肌肉松弛剂巴氯芬（Baclofen）作为 L 型氨基酸运载体的底物，可透过 BBB。另外，BBB 上存在葡萄糖转运体，许多含有葡萄糖的皂苷类化合物就是通过葡萄糖转运体这个途径进入脑内的。例如，人参皂苷 Rb1 上连有 4 个糖基单位，通常情况下这类分子质量较大、水溶性强的化合物很难进入脑组织，然而，研究发现该人参皂苷可以进入脑组织，并且其透过脑血管内皮细胞的能力受到葡萄糖转运体的影响，当给予抑制剂抑制葡萄糖转运体功能或用大量葡萄糖竞争葡萄糖转运体时，人参皂苷 Rb1 通过脑血管内皮细胞的量减少。此结果提示，将药物结构进行适当改造（如连接上糖基）是一个十分有前景和值得考虑的方法，有利于提高药物进入脑组织的比例，是未来 CNS 药物设计的一个有前途的方向。

4. 抑制外排药物的特殊转运蛋白

对于那些能被外排蛋白（如 P 糖蛋白、多药耐药蛋白）排出的药物而言，通过抑制相关蛋白的功能减少其对药物的主动外排也可以增加药物在 CNS 中的分布。例如体外细胞培养实验证实 P 糖蛋白抑制剂如右旋维拉帕米可以显著抑制 P 糖蛋白底物多柔比星、长春新碱的外排。整体动物实验也显示了 P 糖蛋白抑制剂可以增强这类药物在脑组织中的保留。Sandrine 等用大鼠研究了 P 糖蛋白抑制剂 SDZ PSC833 对秋水仙碱的脑内分布变化，发现同时给予抑制剂后较不

给予抑制剂组大鼠脑内秋水仙碱分布量增加了 10 倍。而另外一项实验研究了环孢素对罗丹明- 123 在脑内的动力学特性影响，结果表明合用环孢素后罗丹明-123 在脑内的曲线下面积（AUC）增加了 3 倍，而血浆中的 AUC 几乎没有改变。这些实验结果提示联合使用特殊转运蛋白抑制剂是一个有效和可靠的方法。特别是现在，P 糖蛋白抑制剂的研究进展迅速，已经发展至第三代，使得抑制剂的亲和力增强、选择性提高、用量减少、毒副作用减轻，将治疗药物与这些外排转运体抑制剂联合使用极有希望大大提高 CNS 疾病的治疗药物进入 CNS 的比例，最终达到增强治疗效果的目的。

参 考 文 献

赵志刚,龚凌志. 2000. 血脑屏障及药物通过血脑屏障方法研究进展. 中国药学杂志,35 (4): 227～230

Baumert C, Hilgeroth A. 2009. Recent advances in the development of P-gp inhibitors. Anticancer Agents Med Chem,9(4):415～436

Bodor N, Buchwald P. 1999. Recent advances in the brain targeting of neuropharmaceuticals by chemical delivery systems. Adv Drug Deliv Rev,36 (2): 229～254

Desrayaud S, Guntz P, Scherrmann JM, et al. 1997. Effect of the p-glycoprotein inhibitor SDZP-SC833 on the blood and brain pharmacokinetics of cochicine. Life Science,61: 153～163

Juillerat-Jeanneret L. 2008. The targeted delivery of cancer drugs across the blood-brain barrier: chemical modifications of drugs or drug-nanoparticles? Drug Discov Today,13(23～24):1099～1106

Van Bree JB, Audus KL, Borchardt RT. 1988. Carrier-mediated transport of baclofen across monolayers of bovine brain endothelial cells in primary culture. Pharm Res,5(6):369～371

Wang Q, Yang H, Miller DW, et al. 1995. Effect of the p-glycoprotein inhibitor cyclosporne A on the distribution of Rhodarmine-123 to the brain:in vivo microdialysis study in freely moving rats. Biochemical Biophysical Research Communications,211: 719～726

撰稿人:周 芳[1] 阿基业[1] 王广基[1] 毛世瑞[2]

1 中国药科大学

2 沈阳药科大学

如何确定含有多个有效成分的单味中药的给药剂量

How to Determine the Dosage of a TCM Containing Multiple Active Components

在临床药物治疗中，药物在体内的浓度只有维持在一定的范围内才能发挥药效，低于这个范围药物不能产生药效，而高于该范围往往产生毒副作用。这里的药物浓度指的是在一定的给药剂量下真正进入体内（通常指进入血液循环）的那部分药物，药物在体内的浓度是发挥药效的基础，其浓度的高低决定了药效的强弱。一般情况下，体内药物浓度取决于给药剂量，且在一定的给药剂量范围内给药剂量与体内药物浓度成正比关系，即较高的给药剂量会使体内药物浓度也较高，较低的给药剂量使得体内药物浓度也较低，合适的给药剂量可以使药物在体内处于有效浓度范围内从而发挥治疗作用。对于只含有单个成分化合物的药物来说，问题较为简单。但对单味中药来说，其也往往含有多个具有药理活性的化合物，如人参（含多种人参皂苷）、三七（含多种三七皂苷）、丹参（含多种丹参酮、丹参素）、银杏（含多种银杏内酯和银杏黄酮）等都含有多个有效组分，这些单味中药给药剂量是如何确定的呢？

含有多个有效组分的中药因为其中化学成分复杂，各个组分存在药效学和药动学差异，科学地确定给药剂量也是一个十分复杂的问题。为了便于理解如何确定含多组分的中药给药剂量的问题，先以单个组分药物剂量的确定方法为例进行说明。首先，不同药物发挥药效作用的浓度不同，有些药物（如激素类、神经受体激动/抑制剂类）在很低浓度下就可以发挥显著的药效作用，给药剂量往往小至毫克（千分之一克）甚至微克（百万分之一克）；而有些药物（如抗生素）需要较高的浓度才能发挥有效作用，给药剂量常以克为计算单位，给药剂量差别巨大；其次，不同药物在体内吸收、分布和消除的特点各不相同，对于口服药物来说，那些口服吸收比例高、容易分布到靶组织/器官、不很快被代谢/消除的药物在体内浓度较高、维持有效时间长，服用剂量可以较小；而吸收比例低、难以分布到靶组织/器官、容易被代谢或消除的药物在体内浓度低、维持有效浓度的时间短，需要服用的剂量较大。因此，给药剂量的确定主要考虑三个方面的因素：①根据药效学研究结果确定最低药效浓度；②根据药物安全性评价结果确定最大药效浓度（最低毒性浓度/最高安全浓度），从而确定药物作用的有效浓度范围；③根据药动学研究结果确定药物体内浓度与给药剂量的对应关系。最终确定给药

剂量和范围。

上述以药效学和药动学研究结果确定的给药剂量通常是按照人均水平进行制定的，由于个体差异，如民族、性别、年龄、饮食、健康状态、体重、病理因素及微观内环境的差异，不同个体即使使用相同药物也会造成药物浓度较大的差异，轻则引起药效下降、出现不良反应，重则引起药物毒性不良反应和治疗失败。因此如何综合考虑这些因素对不同个体的影响，对给药剂量进行调整十分关键，其难点就在于个体差异因素多样性、复杂性和不确定性。虽然还没有一个普适性的针对个体差异进行药物剂量调整的完整方案，但临床上按照个体体重/体表面积、年龄、性别等因素进行给药剂量调整的方法早已应用并取得较好的临床效果。为了综合考虑个体各项因素的影响，在明确给药剂量、体内浓度和药效强度三者之间关系的基础上，还可以借助于信息学、生物学、药学、统计学的相关知识建立个体因素-剂量-浓度-效应之间的定量关系，即采用群体药代动力学研究方法依据个体差异对剂量进行调整。具体方法如下：第一步，通过实验的方法或者通过零散数据收集的方法获取某种药物大量的临床资料，包括不同病例的民族、性别、年龄、饮食、健康状态、体重、病理因素、生理生化参数、给药剂量、血药浓度、药物疗效等观测结果汇总成表格，这些信息的获得是后续工作的前提。第二步，将这些因素信息进行整理分类汇总，用于结果的分析。第三步，将分析汇总的数据利用统计学理论建立一定的数学理论模型，从中确定影响药物疗效的主要因素，抛弃那些次要的不确定因素，将复杂的问题进行简化，获得一个以药效为因变量，多种影响因素为自变量的关系式，了解每个因素对药效的影响程度和规律。并采用实验结果来验证药效与诸多因素之间的关系式，求证结果的准确性，最后用于给药剂量的调整。

对于含有单个成分的西药或中药单体，上述剂量的确定和调整相对较为简单。但单味中药中常常含有多个具有药效的活性成分，剂量的概念较为模糊，因此也决定了单味中药的剂量确定和调整更为复杂。目前中药使用剂量的确定和调整较多地依赖于中医科医生的经验，而科学合理地确定含有多组分中药的剂量有赖于对中药成分较为全面的认识和了解。首先需要明确该中药中含有哪些主要组分，哪些组分具有药效，其组成和比例如何？为此，研究和建立全面分析中药组分的测定方法至关重要，通过全面分析和测定中药中的成分，明确各个成分在中药中的组成、比例，结合各个组分的药效强弱，综合各个成分的药效和组成比例进行权重，可计算出一个综合体现中药多个有效组分特点、符合中药整体性的“综合剂量”概念，较之用单一成分的含量表示多组分中药药效有明显优势。然而，采用这种方法存在一个明显的问题，不同组分由于理化性质等差别，在吸收、分布、代谢/消除方面存在差异，中药中的有效组分在中药中的组成并不等同于在体内的浓度比例（吸收、分布、代谢速度和程度不一样），因此以中药各

个组分实际进入体内的浓度计算对药效的实际贡献更加合理。另一方面，每一个组分在体内的浓度都存在着时（随时间而变化）空（随部位而不同）差异，全面考察各个组分对实际药效贡献难度极大，因此研究者考虑采用与上述“综合剂量”相似的“整合药物浓度”的概念，用整合后的药物浓度综合代表含有多组分中药浓度实现药物剂量的调整。例如血塞通注射液中主要含有三七总皂苷 R1、Rg1、Rd、Re、Rb1 五种成分，每个成分的药代动力学特点各有不同，以任何一个成分确定给药剂量都失之偏颇，而如果在考察药效基础上，综合考虑各个成分对体内浓度的贡献整合后形成一个统一的药代动力学曲线和参数。与多组分中药的含量表示方法一样，根据一定的原则将多组分中药的每个组分的浓度进行权重和加合就可以获得一个统一的整合体内浓度，这个整合的体内浓度代表了多组分中药体内浓度的整体情况，并明确多组分中药的剂量和体内浓度的关系。这样就为从技术上解决多组分中药体内剂量调整的难题提供了方便，继而可参考上述单一成分的剂量调整方法，对多组分中药进行行之有效的剂量调整，达到多组分中药临床合理使用的目的。

参 考 文 献

Cuddy ML. 2004. Geriatric pharmacology topics: age-related drug dosage adjustment. J Pract Nurs, 54 (3): 11～16

Dartois C, Brendel K, Comets E, et al. 2007. Overview of model-building strategies in population PK/PD analyses: 2002～2004 literature survey. Br J Clin Pharmacol, 64 (5): 603～612

Li XY, Hao HP, Wang GJ, et al. 2008. Integrated pharmacokinetic study of multiple effective components contained in total panax notoginsenosides. Chin J Nat Med, 6 (5): 377～381

Verbeeck RK, Musuamba FT. 2009. Pharmacokinetics and dosage adjustment in patients with renal dysfunction. Eur J Clin Pharmacol, 65 (8): 757～773

Verbeeck RK. 2008. Pharmacokinetics and dosage adjustment in patients with hepatic dysfunction. Eur J Clin Pharmacol, 64 (12): 1147～1161

撰稿人：郝　琨　阿基业　王广基

中国药科大学

药动学-药效学结合模型——连接体内药物浓度与药效关系的桥梁

The Combination Model of Pharmacokinetics-Pharmacodynamics, a Bridge Between Drug Concentration and Drug Effect

人们常说“医药不分家”，医药密切相关的核心内容就是药物与机体间的相互作用。其中，药物对机体的作用称之为药效学（pharmacodynamics，PD），主要是研究药物的效应随时间和浓度变化的动力学过程；而机体对药物的作用，则称之为药动学（pharmacokinetics，PK），即描述药物在体内吸收、分布、代谢和排泄及血药浓度随时间变化的过程。在相当长的一段时间内，两者的研究是分别进行的，并通常认为两者间存在着简单的直接关系，即血药浓度越高，药物的效应（或毒性）越大。但人们在实践中发现这种理解有很大的缺陷，因为很多药物药效与血药浓度（即血中的药物浓度）间并不完全同步，存在一定的滞后。为此，研究者提出了药动学-药效学结合模型（PK-PD model），利用这一模型，可以同时探讨药物体内浓度-时间-药物效应三者之间的相互关系，从而更全面和准确地了解药物效应在体内随剂量（或浓度）及时间而变化的规律。这对预测、监测、判断药物起效（或毒性发生）的时程、指导新药研发，以及临床科学用药、个体化用药，有着极为重要的意义。

早在 19 世纪 60 年代中期，药动学家 Gerhard Levy 就开始了这方面的研究。近年来，随着 PK-PD 模型的应用，尤其是美国食品药品监督管理局（FDA）已明确规定，“开发治疗性药物Ⅰ期临床试验必须提供 PK-PD 模型，以便正确反映该药物的临床药理性质，为Ⅱ、Ⅲ期临床试验奠定基础”。进行新药 PK-PD 模型研究已成为当前的热点，在 2008～2010 年，受国际金融危机的影响，各大医药公司的研发部门都控制规模甚至大幅裁员，但 PK-PD 模型研究方向的专业人员却供不应求。

鉴于药物种类众多及机制复杂，不可能用同一个模型解决所有问题，因而人们在实验数据的基础上，借助计算机程序，不断地拟合、设计、完善新的 PK-PD 结合模型。目前研究较多、比较有代表性的 PK-PD 模型有以下几种：

（1）简单的直接效应模型（simple direct effects）：这是 Levy 在 1964 年最早提出的，认为药效与药物剂量的对数呈线性，方程式如下：

$$E = m \cdot \log A + e$$

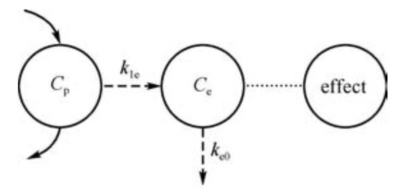


图 1　双相分布模型

C_p 是血药浓度，C_e 是效应部位的药物浓度，k_{1e}是药物从血液向药效部位的转运常数，k_{e0} 是药物从药效部位的消除，effect 是最终的药物效应

其中，E 是药效，A 是药物剂量，m 与 e 是常数。

这是最早使用的 PK-PD 模型。

（2）双相分布模型（biophase distribution model）：这一模型认为药物要分布到作用部位才能发挥药效，且这一分布过程是一限速步骤（图 1）。

这一模型认为药效是与作用部位浓度相关，而不是与血药浓度相关，因而可以解释药效滞后于血药浓度的现象。

（3）受体结合模型（slow receptor-binding model）：这是基于药物作用的受体-配体学说而建立的模型，适用于这一药用机制及与离子通道相关的药物的 PK-PD 建模。方程式如下：

$$\frac{dE}{dt}=k_o n \cdot (E_{max}-E) \cdot C_p - k_{off} \cdot E$$

其中，k_{on} 与 k_{off} 分别是受体与配体结合与解离常数，E_{max} 是最大药效，其他字母含义同上。

（4）不可逆药效模型（irreversible effects）：主要应用于可导致细胞程序性死亡等不可逆药效的药物的 PK-PD 建模。

（5）间接效应模型（indirct response model）：这是 Jusko 等基于药物作用机制而提出的模型。因为很多药物在体内主要通过兴奋或抑制某一因子而起药效，如阿司匹林是通过抑制体内前列腺素（PG）的异常生成而起解热、镇痛、抗炎作用，华法林是通过妨碍维生素 K 的再利用从而产生抗凝作用等，因而以这种机制效应为基础建立的模型更具实际意义，是近几年来发展最快、应用最广泛的模型之一（图 2）。

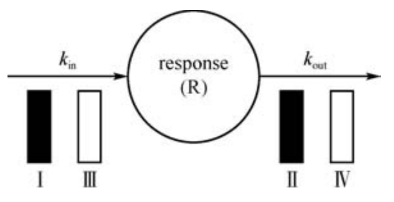


图 2　间接效应模型简图

response 是效应指标，k_{in}是促进药效因素，k_{out}是消除药效因素，Ⅰ～Ⅳ分别代表药物作用的四种不同情况，实心框代表抑制因素，空心框代表兴奋因素

（6）信号转导模型（signal transduction model）：有些药物的药效是在第二信使的调控下，发生级联反应的结果。当这一反应为生化过程中的限速步骤时，药效就会被大大地延迟（图 3）。

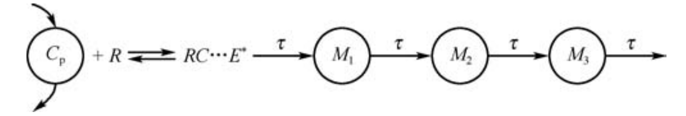


图 3　时间依赖性的转导模型

这一模型已被应用于阿托品、甲氨蝶呤等药物的 PK-PD 的拟合。R 是受体，$M_{1\sim3}$代表转导室，τ代表转导系数

药动学-药效学结合模型的研究与应用，打破了原来医药研究领域中各自独立但彼此割裂的状况，将药动和药效学研究相结合，有利于提高研究的深度和综合性。现在以此为基础，还将病理-药动-药效-药用机制等数据同时关联，构建更为全面和立体的模型。这样的模型，可以最大限度地利用和综合分析实验数据，有利于不同实验室间数据和统计参数的比对，提高分析效率和获取信息量，加速新药研发的进程。同时，多领域间数据的比较与关联，有助于探讨药物作用机制、评价药物相互作用、模拟临床试验、阐明药效个体差异的来源，为临床用药的安全性和有效性提供更为科学的理论依据，引领了医药领域中一个新的研究方向。

不过，PK-PD 模型研究仍然面临许多问题，需要研究人员更多的智慧和方法予以应对。首先是寻找和选择合适的药效指标来评价药物的疗效。因为许多药物的效应不是单一的，而是包含所有作用的总和，且效应在体内是无法直接进行或连续定量测定的，因此必须了解生物标志物的变化与疾病状态之间的相关性，才能使研究更具有临床实际意义。其次是如何解决具有多靶点和（或）多组分特性药物的药动学-药效学结合研究。药物作用机制的多元性，使观测目标或模型构建大大复杂化，必须联合运用分子生物学手段来确定多种机制之间的相互作用及其与药效间的关系，才能进行合理的构建与阐述。

最后，值得一提的是，PK-PD 模型是药学、医学和数学的交叉学科，需要研究者同时具备医学、药学和计算机编程的知识背景，才能理解 PK-PD 模型的意义、把握实验的设计与操作，使其最终的结果更接近生命本质。目前国内能胜任的专业人员很少，这是限制我国 PK-PD 模型发展最重要的原因。我国应注重对该领域中研究者的培训，组建专业互补的研究团队，以更快地与国际接轨，促进我国新药的创新与开发。

参 考 文 献

柳晓泉，陈渊成，郝琨，等. 2007. 药动学-药效学结合模型的研究进展及在新药研发中的应用. 中国药科大学学报，(06)：481～488

Dayneka NL，Garg V，Jusko WJ. 1993. Comparison of four basic models of indirect pharmacodynamic responses. J Pharmacokinet Biopharm，21 (4)：457～478

Jusko WJ. 1971. Pharmacodynamics of chemotherapeutic effects：dose-time-response relationships for phase-nonspecific agents. J Pharm Sci，60 (6)：892～895

Levy G，Mager DE，Cheung WK，et al. 2003. Comparative pharmacokinetics of coumarin anticoagulants L：Physiologic modeling of S-warfarin in rats and pharmacologic target-mediated warfarin disposition in man. J Pharm Sci，92 (5)：985～994

Levy G. 1964. Relationship between elimination rate of drugs and rate of decline of their pharmacologic effects. J Pharm Sci，53：342～343

Mager DE, Wyska E, Jusko WJ. 2003. Diversity of mechanism-based pharmacodynamic models. Drug Metab Dispos, 31 (5): 510～518

Ramakrishnan R, Jusko WJ. 2001. Interactions of aspirin and salicylic acid with prednisolone for inhibition of lymphocyte proliferation. Int Immunopharmacol, 1 (11): 2035～2042

Sheiner LB, Stanski DR, Vozeh S, et al. 1979. Simultaneous modeling of pharmacokinetics and pharmacodynamics: application to d-tubocurarine. Clin Pharmacol Ther, 25 (3): 358～371

Shimada S, Nakajima Y, Yamamoto K, et al. 1996. Comparative pharmacodynamics of eight calcium channel blocking agents in Japanese essential hypertensive patients. Biol Pharm Bull, 19 (3): 430～437

Sun YN, Jusko WJ. 1998. Transit compartments versus gamma distribution function to model signal transduction processes in pharmacodynamics. J Pharm Sci, 87 (6): 732～737

撰稿人：张　琪[1]　王广基[2]

1 南京工业大学

2 中国药科大学

药物靶标功能的计算模拟

Computational Simulation of the Function Related to Drug Targets

1. 背景

人类基因组计划的完成、功能基因的不断发现，以及各种生物技术的快速更新，为有效发现与确认药物作用靶标提供了有利条件。药物靶标已经成为现代药物发现模式中的关键环节。药物靶标是指与某一疾病的发病机制密切相关并能被药物作用而改变其功能的生物大分子，如某些蛋白质和核酸等。与其他生物大分子相似，药物靶标往往通过其结构的不断变化及与上下游分子的相互作用来实现其正常的生理功能。从分子、原子水平上研究药物靶标的结构与其功能关系对疾病发病机制的阐述和药物分子设计都至关重要。

2. 科学意义

药物靶标的精确三维结构主要通过 X 射线衍射晶体学的方法获得，但是这样得到的三维结构往往是静态的、单一的，无法获得与药物靶标功能密切相关的多个构象，也无法研究重要的构象转变过程。此外，如药物靶标与药物分子的复合物晶体结构虽然可以给出药物分子与其靶标结合时的特定作用方式，但是无法推测药物分子与靶标结合和解离的整个动态过程。磁共振技术虽然可以提供动态结构信息，但是对研究体系的大小有严格的限制，无法广泛应用于所有的生物大分子。其他如基因敲除或屏蔽等虽然能对药物靶标的功能研究提供非常重要的信息，但往往缺少对药物分子设计或者药物作用机制研究非常关键的结构信息。计算模拟如分子动力学模拟和简振模式分析等方法正好可以弥补这一不足，可以快速提供药物靶标的多个构象和它们之间的转化过程，以及药物靶标与其上下游或者药物分子相互作用的动态过程 （图 1），从而为疾病发病机制的研究和药物分子设计提供关键信息，加速新药研发进程。

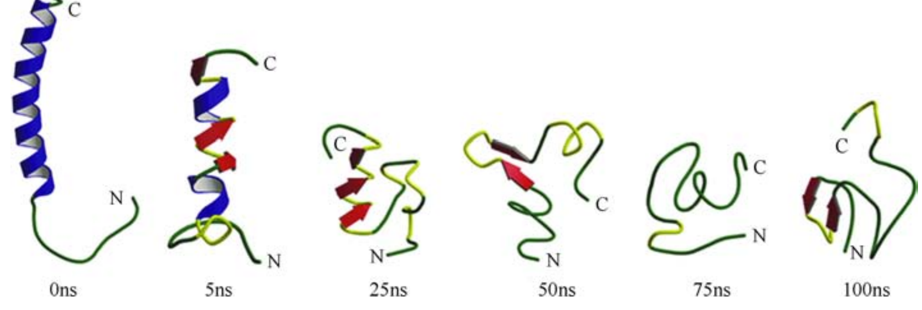


图 1　β-淀粉样多肽从 α-螺旋向随机卷曲二级结构转变的构象演变过程

3. 最新进展

计算模拟尤其是分子动力学模拟方法已经在药物靶标的结构与功能关系研究中发挥了重要的作用。例如，模拟老年痴呆症患者脑中老年斑的主要成分β-淀粉样多肽从α-螺旋向β-片层二级结构转变的整个构象演变过程（图1）。分析这一动态过程发现存在包含α-螺旋和β-片层混合结构的稳定中间体，针对这一中间体进行药物分子设计，获得了抑制β-淀粉样多肽自聚集的小分子抑制剂，为抗老年痴呆症药物研发提供先导化合物。此外，分子动力学模拟还可以捕捉药物靶标与其他分子相互作用的动态过程。例如，通过模拟两个化学结构完全不同的治疗老年痴呆症药物分子石杉碱甲和E2020与同一药物靶标乙酰胆碱酯酶的结合与解离过程，从原子水平上阐明了不同药物的不同作用机制。

4. 主要难点

生物大分子（包括药物靶标）的计算模拟最早开始于20世纪50年代。随着计算机技术和算法的快速发展，模拟的体系从最初的几十个原子扩大到了上百万个原子，模拟的时间尺度也从最初的皮秒扩展到纳秒甚至微秒。然而，现有的模拟方法在模拟的空间和时间尺度上均存在不足。原因是包括药物靶标在内生物大分子实现其生理功能所需的时间通常在毫秒、秒甚至小时这样的时间尺度，例如一些离子通道的门控调节需要几十秒。此外，生物学体系的复杂性表明研究某一生物大分子时必须考虑与其功能实现密切相关的上下游分子及周围环境的作用，而目前的模拟体系都是相对简化的模型，空间尺度受到限制。因此，如何提高计算模拟的时间和空间尺度使得模拟的条件尽可能接近于生理条件是目前的一大难题。关于药物靶标计算模拟的另一难题是如何提高计算模拟方法在能量计算上的准确性。由于目前用于表征体系能量的势函数和用于描述原子特征的力场参数并不完善，使得能量的计算尤其是对药物分子设计非常关键的结合自由能的计算仍然与实验所获得的数值有一定差距。因此，与药物靶标计算模拟密切相关的这两大难题目前尚未完全解决，是药物靶标结构与功能机制研究所面临的瓶颈问题。

5. 展望

关于第一个难题，目前已发展了拉伸分子动力学模拟和靶向分子动力学模拟等通过外加作用力或者能量的方法使得模拟尺度得到延伸，或者通过简化研究体系的粗略度分子动力学模拟，例如仅仅考虑蛋白质的主链原子而将其侧链简化为单个原子，从而使模拟时间达到微秒或毫秒。但是这两种方法的缺陷是偏离了生物大分子发挥功能时的真实条件，因为前者在非平衡状态下模拟生物大分子的动力学行为，有可能得不到真实的运动轨迹；后者忽略的信息很可能对生物大分子的关键功能构象的实现有重要作用，尤其是针对药物靶标的计算模拟，过于简化模型将严重影响进一步的药物分子设计的有效性。针对如何提高计算模拟获得的能量，目前已有将量子力学和分子力学相结合的方式，即在核心区域采用量子力

学精确计算方法，而在周边区域采用分子力学方法，从而提高能量计算的精度。但是这类方法在量子力学与分子力学之间的衔接上仍然存在问题。因此，希望随着计算机技术、计算算法和各种生物实验技术日新月异的发展，尤其是新的科学研究方法及思路的不断涌现，计算模拟的上述难题将逐步得到解决，并在药物靶标功能研究中发挥更加重要的作用。

参 考 文 献

许叶春，沈建华，罗小民，等. 2004. 拉伸分子动力学模拟配体-受体相互作用. 中国科学 B 辑，34(3)：177～187

Karplus M，Kuriyan J. 2005. Molecular dynamics and protein function. Proc Natl Acad Sci USA，102 (19)：6679～6685

Liu DX，Xu YC，Feng Y，et al. 2006. Inhibitor discovery targeting the intermediate structure of β-Amyloid peptide on the conformational transition pathway：implications in the aggregation mechanism of β-amyloid peptide. Biochemistry，45 (36)：10963～10972

Marco E，Gago F. 2007. Overcoming the inadequacies or limitations of experimental structures as drug targets by using computational modeling tools and molecular dynamics simulations. Chem Med Chem，2 (10)：1388～1401

Niu CY，Xu YC，Xu Y，et al. 2005. Dynamic mechanism of E2020 binding to acetylcholinesterase：a steered molecular dynamics simulation. J Phys Chem B，109 (49)：23730～23738

Xu YC，Shen JH，Luo XM，et al. 2003. How does huperzine A enter and leave the binding gorge of acetylcholinesterase? steered molecular dynamics simulation. J Am Chem Soc，125 (37)：11340～11349

Xu YC，Shen JH，Luo XM，et al. 2005. Conformational transition of amyloid β-peptide. Proc Natl Acad Sci USA，102 (15)：5403～5407

撰稿人：许叶春

中国科学院上海药物研究所

小分子化合物与药物靶分子相互作用的过程

The Interaction Process Between Small Molecule Compounds and Drug Targets

随着现代分子药理学、分子生物学和结构生物学等学科和技术的发展，人们已认识到小分子药物必须通过与其靶分子相互作用而发挥生理功能 。但它们之间的相互作用过程极其复杂，不仅存在药物、靶分子和环境之间的能量交换，也存在靶分子结构和功能的改变。至今人们尚未完全了解这种相互作用的动力学过程 。

小分子药物与其靶分子相互作用的动力学过程的研究，主要需要解决两个关键问题，其一是如何准确计算相互作用过程中药物分子和靶分子的各种能量（包括熵、焓、自由能等）的变化，其二是如何准确预测和计算小分子药物诱导的靶分子三维构象和功能的改变。这些关键问题的解决是了解药物分子与其靶分子相互作用过程的基础，对认识药物分子发挥其生理功能的分子机制及提高药物分子设计的准确度都至关重要。

药物分子与其靶分子相互作用始终有溶剂水的参与。在溶液中，药物分子的表面被溶剂水分子包围，而靶分子活性口袋也被溶剂水分子占据，当药物分子与靶分子相互靠近时，界面的溶剂水会被排开，这种去溶剂化的过程促使药物分子和靶分子上的非极性基团相互靠近（图 1），该过程既包含熵的变化也包含焓的变化。当药物分子没有和靶分子发生相互作用时，因为没有受到靶分子受体的约束，药物分子有平动、转动及构型熵，靶分子活性口袋中的部分残基也具有较大的构型熵，但当药物分子与其靶分子结合时，药物分子将失去部分的平动、转动及构型熵，同时靶分子活性口袋中的部分残基也会失去部分的构型熵。显然，这种熵的损失不利于药物分子与其靶分子的相互作用。但另一方面，当药物分子与其靶分子相互接触时，它们之间必然存在氢键、静电、范德华力等非键相互作用，这些相互作用可以补偿药物分子与其靶分子结合时熵的损失。如果这种补偿带来整个体系能量的下降，则药物分子将与靶分子结合形成稳定的复合物。

药物分子与其靶分子的相互作用也会导致靶分子即生物大分子三维结构构象的改变（图 1）。这种三维结构构象改变的直接证据来自于蛋白质的 X 射线晶体结构，即蛋白质在无配体与有配体的情况下其晶体结构有较大差异。关于小分子如何导致生物大分子的结构改变，目前有两种不同的观点：①诱导契合学说(induced fit theory)。诱导契合学术最早由 Koshland 在 1958 年提出，该学说认

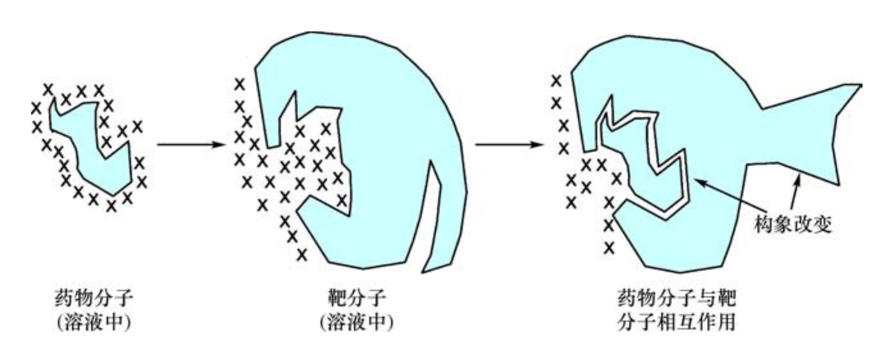


图 1 药物分子与靶分子相互作用的过程

为生物大分子并不是事先就以一种与配体小分子互补的形状存在，而是在受到诱导之后才形成互补的形状。这种方式如同一只手伸进手套之后，才诱导手套的形状发生变化一样。配体小分子一旦结合上去，就能诱导受体大分子的构象发生相应的变化，从而使受体大分子和配体小分子契合而形成受体-配体络合物，这就是“诱导契合学说”。后来，科学家对羧肽酶等进行了 X 射线衍射研究，研究的结果有力地支持了这个学说。②构象选择模型（conformational selection model）。构象选择模型最早由 Monod、Wyman 和 Changeux 等提出，后经多人进一步发展。该模型理论认为，蛋白质未与配体结合时有多种构象形式，其中包括蛋白质的最稳定构象（此构象为非活性构象）和活性构象（即与配体形成复合物时的构象），活性构象由于能量较高，其分布的几率较小。当配体存在时，它会自动与活性构象的受体分子结合，而其他构象又会向活性构象移动。

多年来，人们一直试图使用各种现代实验手段从不同角度研究药物小分子与 DNA、蛋白质之间的相互作用，这些方法主要包括：紫外可见吸收光谱、圆二色光谱、红外光谱、拉曼光谱、磁共振、质谱、电化学、电泳、微量热及黏度等方法。但这些实验方法难以完全捕捉小分子与大分子相互作用的动力学过程，而使用基于量子力学或分子力学原理的分子动力学模拟方法被认为是一种有效的方法。

在计算小分子与生物大分子相互作用过程中体系能量的变化时，可以采用动力学积分、自由能微绕，以及近年来发展起来的 MM/PBSA 方法。在研究构象变化时，由于常规的分子动力学方法在模拟这种长时间动力学过程时一般非常耗时，后来人们对常规动力学方法进行了改进，提出了拉伸动力学（steered molecular dynamics，SMD）、靶向动力学（targeted molecular dynamics，TMD）等方法，最近又提出了粗粒化模型（coarse-grained model）动力学方法。例如，最近 Okazaki 等使用粗粒化模型动力学方法研究了配体和受体相互作用过程中受体构象的变化，他们发现，如果配体和受体间存在强相互作用和长程相互作用时，受体构象的变化则一般归于诱导契合效应，相反如果配体和受体间存在弱相

互作用和短程相互作用，则一般为构象选择效应。Hammes 等使用了一种反应流（flux）描述方法，他们得出结论，诱导契合效应和构象选择模型可能同时存在于一个过程中，它们会随着小分子与大分子浓度的变化而互相转化。

虽然人们已发展了多种理论方法来探索药物分子与生物靶分子之间的相互作用过程，但目前这些方法主要是基于分子力学的方法，分子力学方法虽然计算速度较快，但其计算精度低。而量子力学方法精度较高，但计算速度太慢。一种折中方法是使用组合的量子力学/分子力学（QM/MM）方法，对小分子与大分子相互作用的重要区域使用精度高的量子力学方法，而对于其他区域则使用速度快的分子力学方法。相信随着 QM/MM 理论的发展及计算机运算速度的进一步提升，QM/MM 方法将在探索药物分子与生物靶分子相互作用过程的研究中扮演重要角色，并将推动人们对药物分子发挥其生理功能的分子机制的认识，从而促进创新药物的设计和研发。

参考文献

Hammes GG, Chang YC, Oas TG. 2009. Conformational selection or induced fit: a flux description of reaction mechanism. Proc Natl Acad Sci USA, 106, 13737～13741

Ikeguchi M, Ueno J, Sato M. 2005. A protein structural change upon ligand binding: linear response theory. Phys Rev Lett, 94: 078102

Isralewitz B, Gao M, Schulten K. 2001. Steered molecular dynamics and mechanical functions of proteins. Curr Opin Struc Biol, 11: 224～230

Kollman PA, Massova I, Reyes C, et al. 2000. Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. Acc Chem Res, 33: 889～897

Koshland D. 1958. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. Proc Natl Acad Sci USA, 44: 98～104

Monod J, Wyman J, Changeux JP. 1965. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. J Mol Biol, 12: 88～118

Okazaki K, Takada S. 2008. Dynamic energy landscape view of coupled binding and protein conformational change: induced-fit versus population-shift mechanisms. Proc Natl Acad Sci USA, 105: 11182～11187

Schlitter J, Engels M, Krager P. 1994. Targeted molecular dynamics: a new approach for searching pathways of conformational transitions. J of Mol Graphics, 12 (2): 84～89

Tozzini V. 2005. Coarse-grained models for proteins. Curr Opin Struct Biol, 15, 144～150

Yang LJ, Zou J, Xie HZ, et al. 2009. Steered molecular dynamics simulations reveal the likelier dissociation pathway of imatinib from its targeting kinases c-Kit and Abl. PLoS ONE, 4: e8470

撰稿人：杨胜勇
四川大学

小分子化合物的药效活性预测

Predicting Pharmacoactivity of Small Molecular Compounds

1. 背景

目前临床使用的药物绝大多数是小分子有机化合物，它们和人体的作用十分复杂。一方面是药物对人体的作用，最终产生防治某种疾病的效果，称为药物的药效作用；也可以出现我们不希望的作用，称为毒性或副作用。另一方面是人体对药物的作用，表现为药物的吸收、在体内的分布、生物转化（代谢）和排泄。一个化合物要成为良好的化学药物就必须要有显著的药效而没有明显的毒副作用，同时还应有理想的吸收、分布、代谢和排泄（ADME）性质。药物往往是通过和我们体内的生物大分子（主要是一些称为药物作用靶标的蛋白质）的相互作用，从而调节这些生物大分子的功能而起药效的。药物设计的目的是通过计算机模拟的途径寻找、设计或优化出能与药物作用靶标强烈结合的新型小分子化合物。小分子化合物的药效活性预测的主要任务就是应用各种计算方法对小分子化合物与靶标之间的结合作用强度进行计算预测。

2. 科学意义

如果不能准确地计算这种结合作用强度，药物设计的可靠性就难以保障。除了少数可以和靶标形成共价结合的情况外，药物分子和靶标之间的作用都是分子间作用。要准确地计算这种作用力，需要解决两个基本问题：一个是药物分子和靶标结合的具体位点及结合后所形成的复合物的三维结构，或者说复合物中原子的坐标；另一个是基于蛋白质及其复合物三维结构的药物-靶标之间结合强度（一般表示为结合能或结合自由能，即结合前后体系的能量或自由能的变化值）的计算。比较可靠的蛋白质及其复合物三维结构是通过实验方法（如 X 射线结晶学和磁共振方法等）测定获得的。但由于受实验方法和技术的限制，目前还不能快速大量地测定蛋白质及其复合物的结构数据。如到 2010 年 5 月，蛋白质结构数据库中收集到的结构数据约为 6.5 万套，其中仅约 20% 的结构是小分子和蛋白质形成的复合物结构。另一种获得蛋白质及其复合物三维结构的方法是计算机模拟，通过所谓分子对接的方法构建复合物结构。所采用的蛋白质结构既可以是实验测定的，也可以是通过计算机构建的。但都可能存在一些问题，如晶体结构不一定是蛋白质在生物体内起功能时的结构，而模建的蛋白质及其复合物结构有可能是不准确的。因此，如何获得合理可靠的小分子化合物-靶标复合物的结

构，进而预测小分子化合物的药效活性，就成为一个非常重要的科学问题。

3. 最新进展

20世纪80年代由Kuntz等根据“锁钥原理”发展出所谓分子对接方法及相应的分子对接程序DOCK，获得了广泛的应用，可用来构建复合物的结构。此后，人们又发展了一系列方法和程序，如FlexX、AutoDock、GOLD及Glide等，但基本上都将靶标蛋白作为刚体来处理。近年来，人们发展了同时考虑药物小分子和靶标蛋白结构柔性的分子对接方法以获得更加合理的复合物结构。目前人们试图先采用分子对接方法获取多个可能的复合物起始结构，然后进行大规模分子动力学模拟以获得最可能的复合物模型，为药效活性的计算预测提供合理的三维结构。

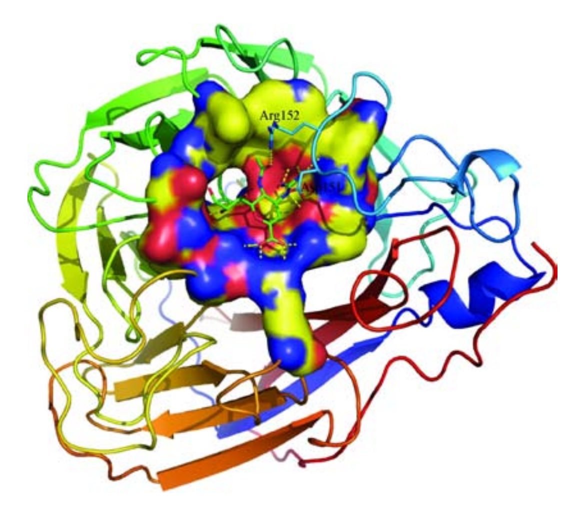


图1　流感A/H1N1病毒神经氨酸酶与药物扎那米韦的结合模式

有关结合作用强度（结合能或结合自由能）的计算方法大致可分为两大类，即量子力学方法和非量子力学方法。从方法的原理来看，量子力学方法是解决这个问题的最终出路，该方法是19世纪初建立起来的用来描述微观粒子运动规律的科学理论体系。以薛定谔方程为代表的量子力学体系为解决包括计算分子间作用力在内的问题提供了一种可靠的理论工具。只要能求出研究对象的波函数，就可以求得体系的性质。但要精确求解这个方程不仅十分困难而且计算量极大，需要的计算机资源随研究体系的增大呈指数级增加。在计算机技术发展和普及之前，人们仅仅能够计算处理由几个原子组成的体系。随着量子化学理论方法及计算机技术的不断进步，目前的量子化学计算方法可以比较精确地计算预测有机小分子化合物的多种物理化学性质。但生物大分子及其所处的环境涉及几万甚至更多的原子，如去除溶剂等分子后，甲型流感A/H1N1病毒神经氨酸酶与药物扎那米韦的复合物仍然含有5819个原子（图1）。为了克服这个困难，人们发展了分子力学和量子化学相结合的（QM/MM）方法，对小分子化合物与靶标作用的核心区域采用量子化学方法，而其他区域则用分子力学等方法进行处理，以实现药物与靶标结合作用强度的比较精确的计算预测。

4. 主要难点

目前，由于分子动力学模拟方法原理及可以模拟的时间尺度的限制，人们还不能可靠地预测药物-靶标复合物的三维结构；同时，由于量子化学计算方法和计算机资源的限制，计算预测的小分子化合物的药效活性与实验结果一般不具有可比性。

为了能够比较准确地开展药物设计，人们发展了多种非量子化学方法来计算预测结合强度，主要分为基于知识的经验打分函数方法、分子力学/分子动力学方法，以及这些方法的组合。在分子对接虚拟筛选时，最常见的是基于牛顿力学发展起来的分子力学打分函数，往往只考虑静电和范德华力作用，可以在几秒到几十秒内处理一个小分子化合物与一个靶标蛋白的对接问题，非常适合大规模化合物库的初筛和排序，但计算得到的结合能或结合自由能与实验结果之间几乎没有可比性。其他方法还包括自由能微扰、热力学积分、线性相互作用能及 MM/PB（GB）SA 等方法。这些方法计算预测结果准确度虽然有所提高，但本身都使用到分子力场，且为了提高速度，都尽量使用比较简单的参数，难以全面描述这种作用，使得药效活性的预测结果仍然难以和实验进行比较。

5. 展望

小分子化合物的药效预测是药物设计的核心问题之一。由于涉及的计算体系较大，使得基于统计力学及量子力学的计算方法目前还不能进行药效活性的精确计算预测。基于分子力学或经验打分函数的方法虽然速度较快，但计算得到的小分子化合物的药效活性（如结合自由能）与实验结果相比相差甚远，这个问题是药物设计和活性化合物结构优化所面临的科学难题之一。近几年，国际上的研究热点是基于量子力学和分子力学相结合的 QM/MM 方法，通过采用可极化力场描述经典力学内部自极化作用，可明显提高小分子化合物与靶标蛋白结合能或结合自由能的预测精度，但计算速度较慢，还不能用于药物的大规模虚拟筛选和结构优化。许多量子化学理论工作者正在发展和尝试各种策略和新方法以实现生物大分子体系的量子化学计算研究。可以预见，随着新方法和策略的诞生，加上计算机技术的进步，终有一天将实现小分子化合物药效活性的精确计算预测。

参 考 文 献

Dian Jiao, Pavel A Golubkov, et al. 2008. Calculation of protein-ligand binding free energy by using a polarizable potential. PNAS, 105: 6290～6295

Kamerlin SC, Haranczyk M, Warshel A. 2009. Progress in ab initio QM/MM free-energy simulations of electrostatic energies in proteins: accelerated QM/MM studies of p*K*a, redox reactions and solvation free energies. J Phys Chem B, 113: 1253～1272

Kaufmann KW, Lemmon GH, Deluca SL, et al. 2010. Practically useful: what the Rosetta pro-

tein modeling suite can do for you. Biochemistry ,49 : 2987～2998

Krzysztof Ginalski. 2006. Comparative modeling for protein structure prediction. Curr Opin Struc Biol ,16 : 172～177

Lu YX , Shi T , Wang Y , et al. 2009. Halogen bonding—a novel interaction for rational drug design. J Med Chem ,52 : 2854～2862

Wei BQ , Weaver LH , Ferrari AM , et al. 2004. Testing a flexible-receptor docking algorithm in a model binding site. J Mol Biol ,337 : 1161～1182

Xu X , Zhu X , Dwek RA. 2008. Structural characterization of the 1918 influenza virus H1N1 neuraminidase. J Virol ,82 : 10493～10501

Zhu WL , Tan XJ , Puah Chum Mok , et al. 2004. The multiplicity , strength , and nature of the interaction of nucleobases with alkaline and alkaline earth metal cations : a density functional theory investigation. J Phys Chem A ,108 : 4008～4018

撰稿人:朱维良

中国科学院上海药物研究所

单分子-多靶标的设计方法

The Approaches to Drug Design of a Single Molecule Against Multiple Targets

基因组学、蛋白质组学和高通量筛选技术的发展，使得药物研究从传统的表型和整体动物筛选转变为从分子水平入手，进行细胞水平和整体动物多层次的筛选。当代药物研究更加重视和突出以功能蛋白为靶标，采用“一病一靶一分子”（one disease-one target-one molecule）的新药创制策略，设计高亲和力和高选择性的药物分子，创制高效低毒的新药，该策略强调了药物分子对单一功能蛋白调节的选择性。最近的研究表明：高选择性单一靶标分子在临床中常常表现出有效性低、安全性差，主要原因可能有两个：一是各种功能蛋白均处于一个复杂的生物调控网络系统中，与许多其他蛋白质发生相互作用，过度抑制或激活某一蛋白质，在抑制蛋白质产生的病理作用的基础上，也会干扰蛋白质所承担的生物功能，导致药物的安全性降低；二是生物网络系统具有内在的稳固性和对外来刺激引起变化的抵制性，细胞可以通过启动其他信号转导通路，补偿由于某一蛋白质被抑制或激活对生物网络系统的影响，降低了药物的有效性，产生耐药性。

因此，以系统生物学为基础，针对疾病发生的多个病理环节，设计多靶点的单一药物分子，同时调控疾病发生发展的多个信号转导通路，尤其是对于多基因调控的复杂疾病，是非常必要的。事实上，应用中药和多组分药物（multicomponent drug）及联合用药（multidrug combination）治疗复杂疾病如神经退行性疾病、HIV 和癌症等，就是通过调控多个靶标，达到治疗目的的经典范例。但是上述方法存在药代性质谱复杂、药物-药物相互作用及患者依从性差等缺点。现代多靶点药物主要是指一个药物分子作用于疾病的不同病理环节中的多个药物靶标，产生协同作用，药物分子的理化特征是单一的，避免了药物相互作用和配伍禁忌，达到安全有效的最佳治疗效果。例如多靶标药物培美曲赛（Pemetrexed）是胸苷酸合成酶和二氢叶酸还原酶抑制剂，能够同时阻断癌细胞生存所必需的、多个与叶酸系统相关的酶的活性，从而抑制嘌呤及嘧啶的生物合成，影响 DNA 的合成，具有较强的抗肿瘤活性和广谱抗瘤性。

针对多个靶标，理性设计多靶点药物分子具有可行性，这是由于许多疾病的发生和发展是由同一超家族受体功能紊乱造成的，同一超家族受体又存在多种亚型。这些超家族受体及其亚型的结合位点存在相似性，可基于靶标结合腔形状和

电性分布的相似性，设计多靶标小分子抑制剂。此外，许多内源性配体如激素和神经递质作用于多种功能蛋白，产生生物功能，为基于配体的相似性设计多靶标药物分子提供了结构依据。再者，有一些小分子可作用于不同超家族受体或内源性配体不同的靶标，是因为蛋白质三维结构比序列更具保守性，存在相似的结合腔。研究不同受体所能容纳的空间和化学特征，设计多靶标分子，结合腔的兼容性是该类多靶标分子的设计基础。

然而，目前临床中应用的多靶标药物分子如抗精神病药物奥氮平（Olanzapine）等均为偶然发现的多靶标药物分子。针对某一疾病发生发展的多个关键药物靶标，进行理性药物分子设计，发现和优化多靶标配体（designed multiple ligand，DML），还只是刚刚起步，面临着许多艰巨的挑战，主要体现在以下几方面：

理想的多靶标药物分子应该是在相同的血药浓度下，对调控的每一靶标均能调节到适当的强度，即多靶标分子对不同靶标的最佳活性比是决定化合物安全有效性的关键参数之一。但由于受体占有率水平不同、受体或酶在不同组织中表达水平不同、药物在不同组织中的分布不同，均对多靶标分子在体内的平衡有影响，使得优化不同靶标的活性比成为一项难以预料的研究工作。随着调控靶标数目的增加，这种艰巨性会更加显著。

设计选择性药物分子，减少药物的非特异性毒性一直是药物化学家的追求。针对单一靶标设计高选择性分子，目前仍是一个挑战性的工作。针对多靶标设计具有相对选择性（wide selectivity）的化合物，进一步加大了设计的难度，尤其是针对不同家族和不同内源性配体的多靶点配体。

多靶点药物分子药代性质的优化是药物化学家需要面临的另一个挑战。多靶标先导化合物通常具有分子质量大，Clog P 值偏高的特点，不易发展成口服生物利用度高的药物。在现有优化化合物成药性技术不是很成熟的情况下，改造质量相对较低的多靶标先导化合物，仍然面临着较大的困难。

先导化合物的质量是决定新化学实体成药性的重要因素，尤其是多靶点药物分子的先导化合物，一方面是由于同时优化分子的多个参数是非常困难的，另一方面是多靶标分子的限制性因素多，可优化的空间小。因此，在先导物的发现阶段，尽可能地设计高质量的先导化合物是应对多靶点药物分子优化挑战的策略之一。多靶标配体的发现主要有两种方法：一种是筛选定向化合物库；另一种是基于知识设计多靶标分子。作者认为，将基于药效团和基于片段方法联合应用，依据多个靶标对公共的药效团特征的要求，设计多靶标配体，可能是一个有效的方法（图 1）。该方法产生的分子具有结构多样性、质量小和优化空间大的特点。通过该方法产生的多靶标分子，由于舍弃了部分靶标的某些药效团特征，导致化合物对单一靶标结合力弱；但化合物通过调节多个靶标，产生的协同作用有可能

补偿对单一靶标结合活性的丢失。但是优化化合物的相对选择性仍是需要面临的难题之一。

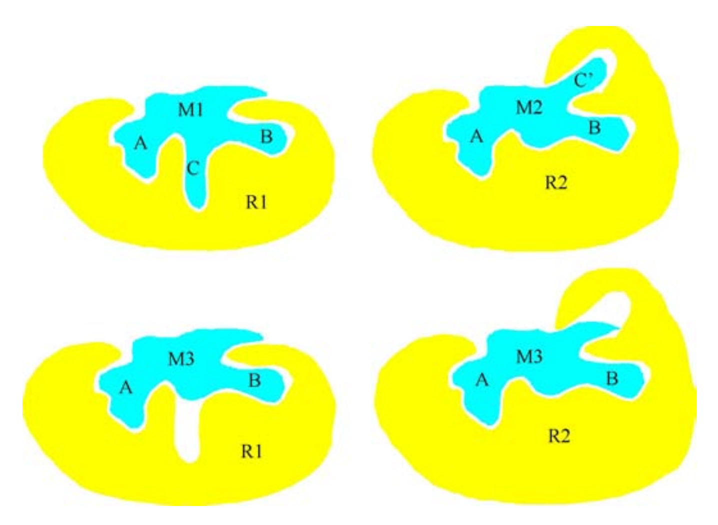


图 1 M1 和 M2 分别为受体 R1 和 R2 的选择性配体，依据 M1 和 M2 的公共药效团特征，设计的双靶标分子 M3 与 R1 和 R2 均可结合

总之，针对疾病发生发展的多病理环节，设计多靶标药物分子，治疗多基因调控的复杂疾病是一个艰巨的研究工作。分子生物学、系统生物学、结构生物学、化学信息学和计算化学的发展，将为这一挑战性研究课题提供越来越多的解决方案。

参 考 文 献

郭宗儒. 2009. 药物分子设计策略：双靶标药物设计. 药学学报,44(3)：209～218

Kola I, Landis J. 2004. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? Nat Rev Drug Discovery,3(8)：711～716

Morphy R, Kay C, Rankovic Z. 2004. From magic bullets to designed multiple ligands. Drug Discovery Today,9(15)：641～651

Morphy R, Rankovic Z. 2007. Fragments, network biology and designing multiple ligands. Drug Discovery Today,129(3～4)：156～160

Morphy R,Rankovic Z. 2009. Designing multiple ligands-medicinal chemistry strategies and challenges. Curr Pharm Des,15(6)：587～600

撰稿人：徐柏玲
中国医学科学院药物研究所

如何合成多样性化合物库

How to Synthesize Diversified Compound Library

1. 背景

生命科学和生物技术的迅速发展为新药研发注入了全新的理念。大约有2500种人类基因编码的蛋白质能和药物类化合物结合，但目前仅发现了40%的化合物，从化合物库中筛选是发现这些活性化合物的主要手段。传统小分子化合物结构简单且相似，而生物靶标结构复杂，易和结构较复杂的小分子特别是天然产物相互作用；同时，在包含细胞或组织的类似遗传的表型筛选中，结构多样性的分子库与传统小分子库相比成功率更高。此外，这些化合物是研究生物系统的重要工具——生物探针，这些探针分子可用来阐明细胞作用机制，如信号转导、细胞调控周期、细胞代谢及功能等，进而发现相关疾病治疗的重要靶点。因此，合成高质量的多样性化合物库，提高发现活性化合物的成功率是新药研究的保证。

2. 科学意义

建立具有结构多样性、高质量、大范围的化合物库成为新药研发中的一个重要问题。"化合物库"这个名词定义很广，可由混合物组成，也可以由一系列具有相似结构的化合物组成，或者是若干不连续的化合物的集合体，化合物数量可以从几个到几千个甚至上万个。

迄今为止，化合物库主要来自通过定向合成法合成的化合物、天然产物及由组合化学法合成的化合物。定向合成（target-oriented synthesis，TOS）是最常用的合成方法，它从目标化合物着手，通过反合成分析得到反应产物中的关键结构转化子，逆推出上一步的反应物结构，重复此过程，最终得到相对简单的基本合成子。通过TOS构建的化合物库需要以已知的活性先导化合物为基础，通过构效关系研究，不断对化合物结构进行改造。由此可见，由定向合成构建的化合物库缺乏结构复杂性和多样性，不能满足药物筛选和生物基础研究的要求。此外，TOS合成的化合物很难达到如天然产物那样相对复杂的结构和丰富的立体构型，特别当其作为小分子生物探针时，不能更好地模拟或实现其与蛋白质相互作用的调控，这也是传统化合物库的另一个不足之处。

组合化学的提出及应用在一定程度上加速了构建多样性化合物库的速度，但也同时遇到了一些问题：一是由于原料或反应过程的限制，只能得到相对简单的化合物库，而实现多样化的官能团和多个手性中心是药物研究中一个非常重要的

问题；二是如何充分利用靶标生物大分子信息，通过针对特定的靶标有目的地构建化合物库；三是如何实现为蛋白靶标提供能与之特异性结合的小分子的合成策略。

3. 最新进展

Stuart L Schreiber 提出的多样性合成（diversity-oriented synthesis，DOS）为我们提供了一个很好的思考空间。多样性合成遵循正向合成分析法（forward-synthetic analysis），在合成过程中尽可能引入多样化的官能团，构建不同的分子骨架，并希望最终建立的小分子化合物库涵盖尽可能多的化学多样性，实现分子结构的复杂性。从化学合成的角度来看，DOS 是从一个原料出发通过运用能产生结构复杂性与结构多样性的反应得到许多产物，在合成中它要运用正向合成分析，产物都是从原料出发分散合成而得。具体而言，多样性合成以相对单一的起始原料出发，以简便易行的方法合成结构多样性和结构复杂性的化合物集合体，再对它们进行生物筛选。合成策略遵循 DOS 的筛选目标并不是针对某一个特定的生物靶标，而是为各种靶标寻找新的配体，进而分析细胞和生物体功能。

4. 主要难点

多样性合成的方法主要以实现分子的复杂性和多样性为主线，复杂性和多样性是该方法的难点。首先，多样性合成可以由产生分子结构复杂性的多组分串联反应、环加成反应和对分子的构象分析来实现。串联反应即第一步的产物可以直接作为下一步原料的反应，由传统的定向合成发展而来，根据多样性合成的特点，衍生出多组分串联反应（multi-component reaction，MCR），MCR 是将 3 个或多个反应物在同一反应器里缩合得到产物，期间可以经历多步串联可逆平衡，但最终生成单一的产物，与经典的串联反应相比，其产物具有更高的收率和纯度，同时多组分反应不仅优化过程简单、合成速度快、操作容易，而且产物的结构容易实现多样化。成熟的 MCR 有四组分的 Ugi 反应和三组分的 Passerini 反应。此外，将 Diels-Alder 反应及逆 Diels-Alder 反应与这些反应结合使用，可以产生五至七元环的化合物。在合成潜在与生物大分子有作用的大环化合物时，需要在这些非环前体上引入构象限制因素以利于成环。Lee 等通过构象分析提出了一种结构复杂的大环类化合物的合成设计方法，即将 3 个同构的反式不饱和烯烃单元插入到环己烷饱和单键中，使化合物构象有利于环合。其次，多样性合成借鉴传统组合化学中常用的方法，在一个分子骨架内引入多个反应中心，每个反应中心都可以连接不通的取代基团，从而实现了构建的多样性。实现立体化学多样性的直接方法是不对称合成，但在多样性合成中，需要确保不对称合成的选择性与实用性。通过引入具有空间位阻的保护基团，可以较好地解决上述问题，从而构建立体化学多样的化合物库。分子骨架的多样性可以丰富化合物的三维结

构，将不同的反应试剂与相同的底物反应，进而得到结构不同的母核，但结构多样性往往不能保证相似的反应活性，这是多样性合成中的一个难题。

以雪花莲胺（galanthamine，图1）为起始化合物展开的多样性合成工作为例，可以更具体地阐述多样性合成在构建化合物库中发挥的重要作用。雪花莲胺是一个具有乙酰胆碱酶抑制活性的天然产物，Henry E Pelish 等基于其结构中含有多个可以进行多样性反应的官能团位点，对分子进行了构建单元改造（图1），在 R^1、R^2、R^3、R^4 所在的位点可以进行 Mitsunobu 反应、共轭加成反应、乙酰化或烷基化反应、亚胺化反应，制备了含有 2527 个分子的多样性化合物库，经过生物活性筛选，发现化合物 secramine 在浓度为 2 μmol/L 时具有阻断蛋白质从高尔基体向质膜转移的活性。尽管雪花莲胺是一个乙酰胆碱酶抑制剂，以其为基础，通过多样性合成构建了具有丰富复杂性和多样性的化合物库，经过生物筛选后，成功地发现了蛋白质转运方面的探针化合物，很好地说明了多样性合成策略的重要意义。

galanthamine

secramine

图 1　多样性化合物库合成的范例

5. 展望

高质量复杂多样的化合物库既可以促进药物的研发，也成为了生物研究的有力工具，因而将会在后基因时代的生物学和有机化学等学科的基础研究中发挥重要的作用。多样性合成理论体系尚需完善，合成方法和数量有限，在化合物分子骨架的构建方面还有待进一步开拓，但多样性合成策略为解决化合物库的多样性和复杂性提供了一个很好的参考，标志着药物化学发展的一个新的里程碑。

参 考 文 献

郭长彬，郭宗儒. 2003. 多组分反应及其在新药研究中的应用. 中国药物化学杂志，13(4)：234～240

Corey EJ，Cheng XM. 1989. The logic of chemical synthesis. New York：Wiley

Lee D，sello JK，Schreiber SL. 1999. A strategy for macrocyclic ring closure and functionalization aimed toward split-pool synthesis. J Am Chem Soc，121 (45)：10648～10649

Lee D，Sello JK，Schreiber SL. 2000. Pairwise use of complexity-generating reactions in diversity-oriented organic synthesis. Organic Letters，2(5)：709～712

Pelish HE，Westwood NJ，Feng Y. 2001. Use of biomimetic diversity-oriented synthesis to discover galanthamine-like molecules with biological properties beyond those of the natural product. J Am Chem Soc，123(27)：6740～6741

Schreiber SL. 2000. Target-oriented and diversity-oriented organic synthesis in drug discovery. Science，287(5460)：1964～1969

Weber L. 2002. The application of multi-component reaction in drug discovery. Curr Med Chem，9 (23)：2085～2093

撰稿人：段文虎　陈　炜

中国科学院上海药物研究所

药物先导化合物的快速发现和结构优化

Rapid Discovery of Lead Compound and Its Structural Optimization

新药创制的整个过程包括两个阶段：研究阶段和开发阶段（图1）。研究阶段又包括靶标确证、先导化合物的发现、先导化合物的结构优化产生候选药物三个重要的里程碑。开发阶段包括临床前和临床研究。先导化合物的发现和结构优化以得到候选药物在新药创制的过程中具有重要的意义。先导化合物的品质和结构优化的结果直接决定着候选药物的质量和成药性，而候选药物的确定决定着开发阶段的所有环节，包括临床前和临床研究的命运，因为候选药物的化学结构决定了药物开发阶段所涉及的药学、药效、药物代谢和安全性等性质及临床效果。

研究证明，大多上市的新药与其最初的先导化合物在结构上有着很高的相似性，因此先导化合物的发现和优化对于新药创制的成败具有至关重要的影响。据统计，大约40%的临床失败的候选药物是因为药物代谢和（或）药物动力学性质缺陷造成的。为了提高临床试验的成功率，降低研发成本，提高研发的速度和效率，先导化合物的成药性越来越受到重视。基于此，将药效学、药代动力学和物理化学性质的综合评价提前到先导化合物的发现和优化阶段，尽早将成药前景差的化合物剔除，是目前新药研发普遍采用的策略。

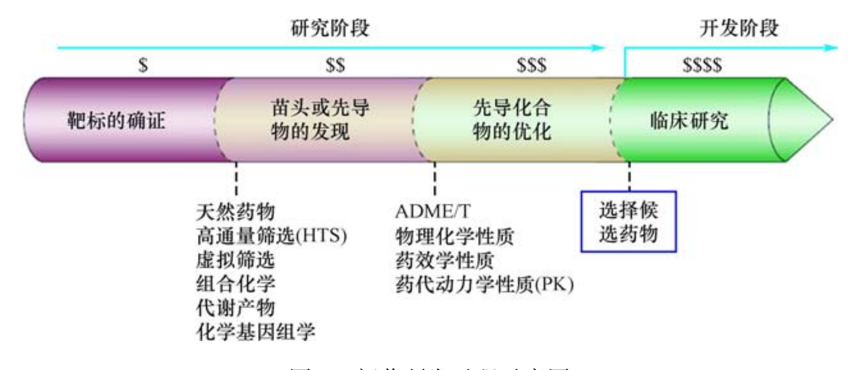


图1　新药研发过程示意图

先导化合物的发现和优化是多个学科相互交叉，多个部门相互协作、相互反馈和彼此促进的过程，而目前主要的问题是各个学科整合的力度不够。就先导化合物的发现来说，从天然产物发现先导化合物具有偶然性，组合化学和高通量筛选的化合物分子结构多样性较差，并且目前的知识还难以通过靶标的结构设计出

先导化合物。在先导化合物的优化过程中，传统的结构改造和生物测试循环过程费时费力，成本非常高。需要运用药物化学知识指导优化设计，合理运用计算机化学对化合物物理化学性质进行预测。

先导化合物是在药理或生物化学试验相关的筛选中表现出生物活性和选择性的化学结构或一系列结构原型。选择的先导化合物必须在药效学、药代动力学、物理化学性质和安全性上达到一定的要求。在药效学上，先导物对靶标分子具有显著的生物活性和特异性，并具有明确的作用机制和构效关系（SAR）。在药代动力学上，具有适宜的吸收、分布、代谢和排泄（ADME）性质。在物理化学性质上，先导物应具有较小的分子质量和较大的结构优化空间，适宜的水溶性和脂水分配系数。在安全性上，具有较高的化学稳定性，不但本身毒性非常低，而且不产生毒性代谢产物。从化合物的结构上，先导物的结构应具有新颖性，可以获得专利保护，以保障研发药物的知识产权。

先导化合物的发现主要通过随机筛选（如天然产物，组合化学和高通量筛选）和理性的设计（基于受体或配体结构和机制的分子设计、内源性配体、优势结构、上市药物的代谢产物）。天然产物是先导化合物的重要来源，具有分子多样性的优势（吗啡、青蒿素、喜树碱和紫杉醇等），但从天然产物发现先导化合物具有偶然性，发现的几率较低。组合化学和高通量筛选途径具有筛选化合物数量大、速度快的优点，但是化合物分子结构多样性较低，成药性质较差，并且需耗费大的人力物力。理性的设计需要通过突变、磁共振和单晶 X 射线衍射或内源性配体结合靶标的结构信息进行设计，但目前的知识还难以通过靶标的结构设计出先导化合物。因此，目前更多的是采用整合的方法，将高通量筛选与计算机化学方法（虚拟筛选）结合起来，对结构多样性的聚焦性化合物库进行快速反馈的搜索。

先导物的优化是将具有生物活性的化学结构转化为候选药物的过程，是从药效学、药代动力学、物理化学和安全性等对先导化合物的分子结构进行多角度多参数的多次循环操作。这也是一个通过结构改造和生物试验的交替进行和相互反馈，从而达到诸多成药参数的最佳组合的过程，包括提高化合物对靶标分子的特异性，改进化合物的代谢稳定性，或改善化合物的溶解性和化学稳定性等。同时还需在细胞和整体动物水平测试先导化合物物的药效活性强度和药代动力学性质（ADME），进而评价化合物的口服生物利用度。对化合物的毒性进行评价和进一步结构优化，以提高安全性。将各种生物学方法的试验结果进行整合，运用药物化学知识指导优化设计，循环往复，以达到各项成药性质（药效强度、选择性、ADME/T 和物理化学性质）的最优组合。在先导化合物的优化过程中，合理运用计算机化学对化合物物理化学性质（$\log P$、$\log D$ 和 $\mathrm{p}K_a$）、药代动力学性质（ADME）和毒性等进行计算和预测，可以加快优化过程并节约研发成本。

如 DPP-Ⅳ抑制剂 sitagliptin（3）（图 2）的发现，就是首先通过在先导化合

物 1 中并入哌嗪杂环以提高代谢稳定性得到化合物 2，其药代动力学性质得到了明显的改善，并且通过在苯环上引入氟原子，提高了化合物的活性（IC_{50} = 37nmol/L），但是其口服生物利用度非常低。因此，在进一步的结构优化中，通过在三氮唑环上引入三氟甲基，大大改变了整个分子的疏水性，降低了三氮唑环的富电性质，提高了整个分子的化学稳定性，从而提高了化合物的口服生物利用度，活性也得到进一步的提高（IC_{50} = 18nmol/L）。这使得 sitagliptin（3）成为第一个上市的 DPP-Ⅳ抑制剂用于 2 型糖尿病的治疗。

图 2　DPP-Ⅳ抑制剂 sitagliptin

先导化合物的发现和优化在整个药物研发过程中占有极其重要的地位，决定着候选药物的品质和后续开发的命运。尽管化学、生物学和计算机科学等学科的发展大大促进了先导物的发现和优化，但先导化合物的发现和优化的有效性与快速性仍然是新药研发过程中亟须解决的课题。加快先导化合物的发现和优化需要整合化学（天然药物化学和合成化学）、生物学和计算机科学等的力量，充分发挥各学科在药物研发中的作用，降低药物研发成本，加快我国的药物研究进程。

参 考 文 献

郭宗儒 . 2008. 药物分子设计的策略：苗头和先导物的品质决定新药的成败 . 药学学报，43，898～904

Bleicher KH，Bohm HJ，Muller K，et al. 2003. Hit and lead generation：beyond high-throughput screening. Nat Rev Drug Discov，2(5)：369～378

Caldwell GW，Yan Z，Tang W，et al. 2009. ADME optimization and toxicity assessment in early- and late-phase drug discovery. Curr Top Med Chem，9：965～980

Kim D，Wang L，Beconi M，et al. 2005. (2*R*)-4-Oxo-4-[3-(Trifluoromethyl)-5，6-dihydro[1，2，4]triazolo[4，3-*a*]pyrazin-7(8*H*)-yl]-1-(2，4，5-trifluorophenyl)butan-2-amine：A potent，orally active dipeptidyl peptidase Ⅳ inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. J Med Chem，48：141～151

Siegal G，Eiso AB，Schultz J. 2007. Integration of fragment screening and library design. Drug discov. Today，12：1032～1039

撰稿人：张　翱
中国科学院上海药物研究所

药物合成工艺优化与思考

The Major Considerations for the Route Evaluation and
Process Optimization in Production of Active Pharmaceutical Ingredients

对特定有机化合物合成路线工艺性能的要求是随着对该化合物的需求量的增加而提高的。评价一合成路线工艺优劣的广义标准是该路线工艺产生的经济性、生态性及社会可持续性。具体一点讲，好的路线工艺必须在实际应用中满足如下基本要求：简便、低耗、安全、低污染。

好的路线工艺大都是经过反复多次的实验室“小试”与车间“放大”过程的验证，综合考虑实际生产操作环境与过程（例如材质、形状、均质性、滴加速度、搅拌器与搅拌效率、热传系数等）中的各种因素进行优化、验证、调整的结果。

与路线工艺优化有关的因素有很多，我们不可能把所有相关变量信息数据收集齐备后再做出结论。在实际评估优化实践中，要善于根据具体情况，分析、甄别并抓住主要因素，解决主要矛盾。以下是实际研究与应用过程中首要考虑的因素或首先要解决的问题：

1. 合成路线评估确定

在已有的合成路线或相似路线资料信息数据基础上，结合合成化学的内在本质与规律，以及合成化学家自身的专业素养与经验，比较、筛选出自身能力范围内所能确认的最优路线方案。必要时或不得已时，大胆创造或预测出可能的方法路径。切记，只有在你认为你所选择或设计的路线方法是你目前所能给出的最优方案，并经过实验室探索证实之后，再开始对该路线方案进行工艺优化工作；还有，由于任何个人或团队的知识与经验的局限性，对甲而言是好的工作方案，在乙那里可能被视为缺乏实用意义。

2. 绿色可持续性

所有化学工作者必须把“鸟语不再，惟余空山”的可怕景象作为人类社会发展的警戒，从路线设计与评定的源头开始，直至工艺优化的各个环节，逐一消除产生污染的可能性，使最终付诸应用的工艺路线不产生或尽量少产生副产物或污染物，趋于理想的“零排放”目标。

3. 安全与健康

安全无小事。合成化学家需要有良好的天分与直觉，不仅能够在路线设定时

就避免不安全物料与操作，同时要能够感觉预知反应系统中各物料或因素之间可能发生的相互作用与潜在风险，并通过适当的仪器测试手段度量、评估风险的放大效应及在放大生产过程中的可控性。工艺过程的细节操作必须充分考虑对现场工作人员的健康危害程度并制定出严格、可行的防护措施。

4. 物料与成本

路线工艺的设定与优化过程中，要充分考虑如何获得并使用价廉易得的物料（例如起始原料、辅料、试剂、催化剂等）。某一物料可能因为目前的应用面窄、使用量少而价格较高或很高，但这不代表将来使用量大时的真实成本。要尽量减少无机盐例如无水硫酸钠、饱和盐水的使用。当然，要同时注意所用物料的安全可控性与可持续性，例如所用催化剂在要求催化作用明显、选择性好的同时，要考虑易于回收、残留少、低毒或无毒，优先选用生物质材料等。

5. 溶剂或介质

反应溶剂或介质的选择应遵循以下原则：不影响反应系统；毒性低；挥发性低；种类和量少；无溶剂反应；以乙醇为溶剂；以水为溶剂；溶剂的回收利用；超临界流体、氟化物、离子液体等非传统概念溶剂系统的应用尝试。但通常情况下，任何溶剂或介质系统的评估与确立都不是由单一变量决定的，同样要综合考虑安全、健康及经济性、可持续性等诸多因素，从而形成了工艺优化过程中的又一难点。

6. 能耗

要尽量避免使用长时间加热的反应条件，不仅消耗能量，而且反应过程中会增加产生杂质的机会，带来一系列其他问题。在使用传统热、电能的同时，要充分发挥想象力，利用电化学反应器、光化学反应器、微波反应器、超声波反应器代替传统的化学过程。除转化率、收率等因素外，要充分考察化学过程中的物质质量与能量的产生、传送、转化与利用情况，合理利用能源，并使所用能源消耗最少。

7. 简便

简便易行的操作不一定是有价值的，但有应用价值的路线工艺及过程必定是遵循了简便易操作的原则。同所有路线工艺优化所涉及的其他因素的评价一样，简便因素也是只有更简便，没有最简便。简便易行的过程是合成化学家与工艺化学家倍加关注并终其整个职业生涯不懈追求的目标之一。

对药物生产企业而言，由于行业特点使然，例如从 GMP 规范管理要求出发，生产商可能会出于对后期变更 DMF 文件或注册资料的费用、耗时及质量因素的考虑，中止对现有工艺路线的优化改进，这从另外一个方面说明了尽早进行路线优化与确立的重要性。只有尽快完成优化工作并付诸应用，企业才能够在销售药品为人类造福的同时，更多地获利并降低成本，以进一步降低消耗、减少污

染物排放，使公众与社会广泛获益。

8. 完善系统集成的理论与方法

路线确立、工艺优化及对“放大效应”的综合研究实际上是一个涉及多变量、多单元、多过程、多学科、多种因素相互影响的非线性系统与过程集成。建立并完善该集成的评估评价方法与体系是学科发展的当务之急，也是药物大规模合成路线工艺优化中的难点之一。建议设立“国家绿色化学奖”，或在中国科学院设立“中国科学院绿色化学奖”，表彰激励全国各界化学工作者加入到专业创新行列，发挥各自的聪明才智，发明设计出新颖可应用的路线工艺，从根本上为我国低耗、低污染的国策实施，为公众绿色和谐生存环境的保持，为企业在绿色可持续生产过程中的利益创造做出贡献。

希望有越来越多的合成化学家参与到“路线工艺研究”这一造福人类社会的事业中来。从合成路线的评估、筛选、验证、确立开始（路线工艺的“出生”阶段），直至对该路线的操作、安全、溶剂、温度、反应器、原材料、中间控制、副反应与污染物等各项因素的综合优化（路线工艺的“长成”阶段），最终诞生的必定是一件过程集成的，在工业界“用料考究、做工精细”，在专家手中拍案称奇并爱不释手的“工艺品”。

下面以具体项目为例，结合其目前存在的问题，说明路线工艺创新优化的具体切入点与重要性。但医药化工行业具体品种项目中需要创新改革之处绝不是下面这几个例子所能够概括的。

（1）氧氟沙星与左旋氧氟沙星合成中由于大量氟化钾的使用（经过优化后，现在工业上平均每生产 1000kg 氧氟沙星或左旋氧氟沙星要另外加入至少 500kg 氟化钾，还不包括反应过程中另外产生的氟化物），使生产设备因氟化物腐蚀造成严重损耗、人员健康受到威胁、局部地下水质的氟含量超标等。

（2）沙坦类药物活性成分例如氯沙坦、伊贝沙坦、坎地沙坦、奥美沙坦等四氮唑环的形成过程需要在二甲苯中高温、长时间反应，消耗大量热能；由于大量（摩尔过量）叠氮化钠的使用，潜在的爆炸风险极大；而大量有机锡化合物的使用对人员健康（过程中有微量有机锡化物逃逸）与地下水环境造成严重威胁。

（3）替米沙坦现有生产工艺在第二个苯并咪唑环形成过程中不得不使用大量多聚磷酸做环合剂与溶剂，后处理过程冗杂，并产生杂质，影响收率，更重要的是大量磷酸盐排入周围水系或渗入地下，严重污染了水环境。

（4）吉西他滨现有工业生产路线需要两次与手性异构体结晶分离的过程，而且母液中仍然含有大量的有用中间体产物与全部的异构体，这些母液最终全部变成污染物。更严重的是，最终产品（β构型）与其α型异构体结晶分离后的水相母液中含有部分吉西他滨与全部的吉西他滨异构体，都有较强的细胞毒性，处理不当会造成严重的健康问题。另外，目前吉西他滨的物料成本仍在每千克 2.5 万元以上。

(5) 6-氯苯并▮唑-2-酮的 2-位氯代反应中需要在较高温度下（大于 150℃）使用过量的氯代试剂，设备腐蚀严重，后续处理产生大量的废水：

寻找简便清洁的氯代方法，或者设计出可应用的合成 2，6-二氯苯并▮唑的新颖路线具有重要的实用意义。

参 考 文 献

汪志勇. 2005. 绿色化学导论. 北京:中国石化出版社

Gadamasettik G. 1999. Process Chemistry in the Pharmaceutical Industry. New York: Marcel Dekker, 14～16

撰稿人:沈敬山

中国科学院上海药物研究所

化学药物合成与环保

Synthesis of Chemical Drugs and Environmentally Sustainable Development

有机化学的巨大发展极大地推动了社会的进步，提高了人们的物质生活水平，但公众对于化学品始终存在着或多或少的误解和排斥，其中一个最重要的原因就在于化学品的安全性及环境污染问题。它就像一个幽灵始终伴随着化学学科及化学工业的成长，从 DDT（二氯二苯基三氯乙烷）到二▮英（dioxin），化学污染事件层出不穷。1962 年蕾切尔·卡逊（Rachel Carson ）《寂静的春天》的出版，拉开了环境保护运动的序幕。这本书为人类的环境保护意识点燃了一盏明灯，促使人类对于各种有害化学品对环境造成的污染进行反思。但直到 20 世纪 90 年代，绿色化学才开始真正兴起。所谓绿色化学，简单地说，就是在设计和生产过程中减少或消除有毒有害物质的产生和使用。人类在绿色化学方面的进展和努力依然十分有限，在发展中国家绿色化学的发展和应用更是任重道远。随着中国制药企业的不断壮大和世界各大制药公司研发中心向中国的转移，中国不但成为重要的原料药生产基地，同时也是承担药物研发外包服务的主要基地之一。令人担忧的是中国对于绿色化学的实施尚缺乏长远的规划，部分化工和制药企业为了追求短期效益，不惜以牺牲环境和员工的健康为代价，缺乏对环境和安全方面的考虑。因此，制药化学的可持续发展问题迫在眉睫。

制药化学的可持续发展涉及环境、社会、经济三个方面的持续发展问题，其中环境方面不但涉及药物的制造过程，还涉及药物使用后进入环境并产生影响的过程，如环境中的激素类药物残留产生的危害已经成为许多科学家的共识。绿色药物化学是绿色化学与药物化学的重要交叉，是制药化学可持续发展的重要环节。绿色药物化学主要是将绿色化学的基本原则引入化学药物的研究和开发。美国化学会提出了绿色化学的 12 条原则，对绿色化学进行了全面的解释和说明。它包括防止废物的产生、设计更安全的化合物、降低合成方法的危险性（如避免叠氮化合物等剧毒和易爆试剂的使用）、使用可再生的原料或试剂（如催化剂的循环使用、氧化剂的再生等）、使用更安全的溶剂和反应条件、使用催化剂而非当量试剂、原子经济和提高能源效率（如使用微波反应缩短反应时间，减少能源消耗）等。所谓原子经济，就是在化学反应中究竟有多少原料的原子进入到了最终产品之中。这一概念由美国斯坦福大学的 Trost 教授提出，是绿色化学的核心

概念之一。原子经济性不但要求尽量节约不可再生资源，而且要求最大限度地减少废弃物排放。理想的原子经济反应是原料分子中的原子百分之百地转变成产物，不产生副产物或废物。绿色化学的 12 条原则多数直接适用于绿色药物化学，只有设计可降解材料等少数原则不太适用。绿色化学的原则应该成为药物研发人员和相关机构（包括企业和研究单位）的共同准则，但真正实施还有比较大的难度。原因是多方面的，其中一个原因就是药物的研发特别强调时效性。对于药物合成而言，合成方法的可靠性是第一位考虑的因素，对环境影响的考虑相对次要。因此，绿色药物化学是在保持方法有效性的同时考虑对环境的影响，不是为了绿色而降低合成方法的可靠性。另外，在绿色化学 12 条原则的实施上还存在一些困难：

(1) 规范的局限性和企业的局限性。12 条原则中更多的是概念上的东西，缺少相应的具体供执行的规范和计划，没有明确的操作指南，而具体的操作指南必须建立在大量的科学实验基础上。另外，药品生产有严格的安全和质量要求，已经建立的成熟工艺能缩短时间、降低风险，具有很强的吸引力，除了可以明显降低成本以外，企业很难有动力去改进合成工艺。

(2) 人员的局限性。一方面相关单位领导（包括企业界和学术界）尽管是经济、法律、商业、公共关系等方面的行家里手，但通常缺乏科学的背景，要么对科学持怀疑的态度，要么对绿色化学的理解不够全面，甚至是误解，以为只是概念的炒作，没有认识到绿色化学不仅是环境问题，更是经济和社会问题，它是药物研发可持续发展战略实施的重要保障。另一方面，从业人员既缺乏相应的意识，也缺乏相应的知识。我们的学校教育侧重传授化学知识，强调的是反应的有效性，如氧化铅、四氧化锇、三氧化铬作为氧化剂能成功氧化哪些基团，忽视了对反应的环境友好性、原子经济性的考虑，也很少涉及化合物的毒性知识及可持续发展的训练。更重要的是绿色化学意识的缺乏，主观上不重视。

(3) 数据库的局限性。有机化学家一个重要的任务就是发展新分子和新试剂，因此对新分子/新试剂等化合物毒性的研究必然是滞后的，也是不可避免的。但实际上即使某些已经大规模使用的化合物，我们对它们的毒性也缺乏了解。20 世纪 DDT 和苯的大规模使用酿成的悲剧即源于此。因此，对已经在较大规模使用但尚缺乏毒性数据及可能在较大范围使用的化合物要进行系统的毒性研究。

(4) 绿色技术的挑战性。与许多无机化学反应不同，有机化学反应很少能定量进行。除了反应不完全、副反应多、反应收率低以外，反应溶剂、试剂、催化剂都要符合绿色化学标准具有相当的挑战性，而且还涉及实验室与工厂生产之间的绿色技术的衔接。例如 Negishi 偶联反应在实验室阶段可以认为是符合绿色化学原则的，但到工艺放大时会产生大量锌的副产物，在排放之前要用氢氧化钠将锌进行沉淀。

尽管存在着各种各样的困难，绿色化学经过十多年的发展，还是取得了长足的进展，许多大的制药公司在反应溶剂、反应试剂的选择方面积累了一定的经验。我们知道，多数有机反应由于化合物的溶解度问题，需要在有机溶剂中进行，而制药工业大约80%的废液来自于溶剂。葛兰素史克和辉瑞等在这方面做了较多的工作，并形成了溶剂选择的初步指南。对于反应溶剂的选择，除了尽量少选用易燃易挥发的溶剂，还要从以下几个方面考虑：①操作人员的安全性，如减少具有致癌、生殖毒性、皮肤刺激等溶剂的使用；②操作过程的安全性，如减少易燃易爆、易产生过氧化物、产生难闻气味溶剂的使用；③对环境的影响，包括对臭氧层的破坏、光化学反应可能性、生态毒性及水源的污染等。因此，像乙醚、苯、卤代烃、吡啶等少用或不用，而水、甲醇、乙醇、丙醇、丙酮、乙酸乙酯等则受到药物研发人员的青睐。近年来尤其是以水和离子液体作为反应溶剂成为绿色化学的热点。以水做溶剂一是经济，二是环保，但缺点在于多数有机物不溶于水或者对水敏感，或者产物易溶于水而难以分离。离子液体由于不挥发、不易燃，是比较绿色的溶剂。但近年来离子液体的真正使用周期和部分离子液体的毒性受到关注，有研究表明 SbF_6^- 和 PF_6^- 等多氟阴离子对环境有很大的毒性。因此，离子液体在制药工艺中的真正应用还有待进一步研究。

反应溶剂的选择相对容易，而反应试剂的选择则更具挑战性。由于反应试剂一般比较活泼，其安全性和环境问题更值得关注。目前国际上只有辉瑞等少数制药巨头开始尝试对反应试剂的选择进行有意识的研究和整理，力图形成一个参考性的指南。一个理想的反应试剂概括起来需要符合以下几个特征：①在各种药物分子及其中间体的合成中都有比较高的收率；②易于用于工艺放大到公斤级的量。这一点通常被实验人员和研究人员所忽略，如Dess-Martin氧化和Swern氧化就存在着工艺放大的问题。Dess-Martin试剂属于高能分子、易爆，而且缺乏原子经济性，其价格在工艺阶段使用是令企业难以承受的。Swern氧化则产生有毒的副产物——一氧化碳和有恶臭的二甲硫醚；③试剂越“绿色”越好，包括试剂的生态毒性和安全性，这与溶剂选择考虑的三个方面是一致的，即对操作人员、操作过程和环境安全性的考虑。举一个简单的例子：酰胺的合成在药物化学中非常普遍，使用的方法各种各样。可以使用缩合剂将羧酸和胺脱水缩合，HATU［2-（7-偶氮苯并三氮唑）-*N*，*N*，*N*′，*N*′-四甲基脲六氟磷酸酯］、HBTU（苯并三氮唑-*N*，*N*，*N*′，*N*′-四甲基脲六氟磷酸酯）、DCC（二环己基碳二亚胺）等都是经常使用的试剂，这些试剂都缺乏原子经济性，HATU和HBTU还是易爆的高能分子；也可以将羧酸制成酰氯，然后与胺反应制备酰胺。可采用草酰氯和氯化亚砜制备酰氯，但二者都不够“绿色”（氯化亚砜比草酰氯要好，因为草酰氯会产生有毒的一氧化碳）。最近有文献报道可以使用硼酸或者有机硼酸催化羧酸和胺脱水缩合得到酰胺的反应，在分子筛的存在下，2-卤代苯基硼酸

甚至可以在室温下催化羧酸和胺脱水缩合，收率可达 91% 。这样的绿色路线就具有相当的吸引力。又如仲醇氧化为酮，有许多氧化剂可供选择，如 PCC（氯铬酸吡啶）、PDC（重铬酸吡啶）、IBX（2-碘酰基苯甲酸）、二甲亚砜/草酰氯、二甲亚砜/DCC、二甲亚砜/三氟乙酸酐、高锰酸钡、二氧化锰、哌啶醇氧化物/次氯酸钠、欧芬脑尔（Oppenauer）氧化等，但绿色的反应路线还是使用次氯酸钠，或者是金属催化的空气氧化等条件。但在使用易燃溶剂时用氧气氧化则存在巨大的风险。

对于某些难以避开的试剂，则要根据绿色化学指导原则进行改进。如烯烃在四氧化锇氧化下生成顺式 1，2-二醇是一个经典反应，但四氧化锇价格昂贵，而且剧毒。近年来该反应有所改进，可用催化量的四氧化锇，在三级胺氧化物（R_3N-O）或叔丁基过氧化氢存在下进行，后者可将反应中生成的低价锇氧化成四氧化锇，重复使用，或者由不挥发的锇酸钾原位生成四氧化锇来进行反应。

除了氧化、还原（包括不对称氢化）、付克反应、氟代等相对经典领域的绿色技术的研究开发以外，近年来碳氢活化、生物催化等领域也相当活跃。其中的原因在于化学界面临的问题不光是科学难题的挑战，其最大的动力是想通过绿色技术革新路线，降低成本，减少对环境的危害，实现真正的可持续发展。在中国这样一个发展中国家，要真正实施绿色药物化学，我们可以先从以下两点做起：

一是观念的改变，这一点至关重要。绿色化学不等同于离子液体、微波化学、超临界流体、生物转化等名词，它不依赖于技术而存在，绿色化学可存在于每一步化学反应之中。绿色化学不一定非要技术上的突破才能实现，如绿色溶剂的选择，以及反应时选择较高反应浓度来减少溶剂用量（尽管部分反应对反应浓度要求比较高）就会对环境产生巨大的影响。二是根据绿色化学指导原则对已有的药物合成路线进行技术上的改进，以达到绿色化学的标准。当然绿色化学在技术上的真正实施还有赖于加大投入、普及教育，提供相应的技术指南和规范，制定前瞻性和可操作性的政策等。

只有坚持绿色化学原则在制药化学中的应用，我们才有可能真正走上环境、经济的可持续发展之路，我们的春天才能永远听到燕子的呢喃、布谷鸟的欢鸣，我们及我们的后代才能拥有永不寂静的春天。Greener Chemistry，Greener Life！

参考文献

杜福强，曹广美，方雨辰. 2007. 从环境保护角度思考医药品生产和使用的管理. 食品与药品，9（7）：59～62

Alfonsi K，Colberg J，Dunn PJ，et al. 2008. Green chemistry tools to influence a medicinal chemistry and research chemistry based organization. Green Chem，10（1）：31～36

Al-Zoubi RM，Marion O，Hall DG. 2008. Direct and waste-free amidations and cycloadditions by

organocatalytic activation of carboxylic acids at room temperature. Angew Chem Int Ed, 47 (15): 2876～2879

Anastas PT, Warner JC. 1998. Green Chemistry: Theory and Practice. New York: Oxford University Press, 30

Cho CW, Jeon UC, Yun YS. 2008. Influence of anions on the toxic effects of ionic liquids to a phytoplankton selenastrum capricornutum. Green Chem, 10(1): 67～72

Kreisberg J. Pharmaceutical pollution: ecology and toxicology. Symbiosis, 2007, 4(2): 5～13

Tucker JL. 2010. Green chemistry: cresting a summit toward sustainability. Org Process Res Dev, 14(2): 328～331

撰稿人：杨春皓

中国科学院上海药物研究所

手性药物的合成与纯化

Synthesis and Purification of Chiral Drugs

当我们伸出双手，可以看出左右手看似相同，但是无论如何也不能将自己的左右手全部重叠；如果将手心相对，则可以看到右手和左手呈现完全的对称关系。这种物质结构间互成“镜像”却无法重叠的关系，就称之为“手性”。

手性是生命体系中普遍存在的现象，构成生命体的有机分子绝大多数都是手性分子，如氨基酸、蛋白质、核酸及糖类等。因此，作为通过与机体发生相互作用而发挥治病作用的药物，自然也就与其分子的手性密切相关，两种手性异构体之间在药效、毒性、药代动力学等方面往往存在差别，有的甚至作用相反。但对这种手性异构体药物作用差异的认识，人类也曾经付出过惨重的代价。20 世纪 50～60 年代在欧洲上市的一种名为沙利度胺（Thalidomide，俗称“反应停”）的药物，能很好地解除孕妇的恶心、呕吐等妊娠反应，受到了广大孕妇的欢迎。但由于其毒性作用，导致了胎儿畸形，出生了 1 万多名四肢短缺的畸形儿，这场由于药物导致的悲剧震惊了全世界。后来的研究发现，有致畸作用的是沙利度胺的左旋异构体（*S* 构型），而其右旋异构体（*R* 构型）并无致畸作用（图 1）。有意思的是，进一步的研究发现沙利度胺是有效的抗肿瘤和红斑狼疮治疗药物，在撤出市场近 40 年后，又作为抗肿瘤和红斑狼疮治疗药物重新上市！这一悲剧使人们充分认识到手性药物的重要性。因此，单一的手性异构体药物的制备在制药工业中有着重要地位。

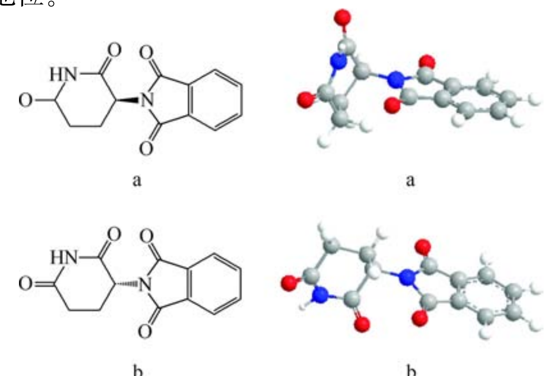


图 1　（*S*）-沙利度胺与（*R*）-沙利度胺的结构及球棍模型对照

a.（*S*）-（－）沙利度胺；b.（*R*）-（＋）沙利度胺

由于合成药物的原料往往无手性或不具备所需要的手性中心，因此采用常规的合成方法得到的产物往往是手性异构体的混合物。为了得到单一的手性异构体，就需要通过控制反应的立体选择性而得到需要的手性分子，或者对通过常规反应得到的手性混合物进行分离而得到所需要的手性物质。前者称为不对称合成，后者称为手性拆分。由于在理论上和技术上面临很多困难，不对称手性药物的高效定向合成和分离仍然面临巨大挑战，是当前有机化学家和药物化学家最感兴趣的热点之一。

不对称合成法是通过立体选择性的反应，直接合成出所需的对映体，是合成手性药物的理想选择。不对称合成要求反应过程能诱导产生高度的立体选择性，而且要求手性辅剂或试剂易于获得，价格便宜，在药物生产中能循环使用。如果是不对称催化反应，则还要求达到较高的催化剂/底物的摩尔比。迄今为止，由于采用不对称合成所得的产物手性纯度大部分难以达到药用要求（一般要求手性纯度在98%以上），在工业上取得成功的实例并不太多。2001年诺贝尔化学奖授予了美国科学家威廉·诺尔斯（W S Knowles）、日本科学家野依良治（R Noyori）和美国科学家巴里·夏普雷斯（K Barry Sharpless），以表彰他们在不对称合成方面所取得的成就。1968年，诺尔斯发现了用过渡金属进行立体选择性催化氢化的新方法，获得了高度立体选择性的对映体，他的研究成果随后被应用于一种治疗帕金森病的药物——左旋多巴的生产。后来，野依良治在诺尔斯的基础上进行了深入而广泛的研究，开发出了性能更为优异的手性催化剂，这些催化剂用于氢化反应，能使反应过程更经济，同时大大减少产生的有害废弃物，有利于环境保护。夏普雷斯则因发现了一种立体选择性烯烃催化氧化法而获奖。他们的发现开拓了高效、实用的不对称合成的新领域，对学术研究和制药工业都具有非常重要的意义。1996年，华裔化学家史一安博士等报道了基于果糖衍生物诱导的烯烃不对称环氧化，该方法由于不需要使用昂贵而且有毒性的过渡金属催化剂、立体选择性高、用途广泛而被称为史一安不对称环氧化反应。此外，基于酶和微生物催化的不对称合成也已取得重要进展，被用于多种重要的药物或药物中间体的手性选择性合成，在合成中引入生物转化已成为制药工业中的关键技术之一。虽然关于不对称合成的研究浩如烟海，但如何实现高效率、低成本、环境友好的不对称合成仍然是药物化学家面临的一个重大难题。

手性拆分法，即将采用非立体选择性合成得到的手性异构体混合物，通过物理或化学的手段，拆分为单一手性异构体。由于有一部分手性异构体属于不需要的副产物，采用拆分的方法自然不符合原子经济性和绿色化学合成的要求。但由于外消旋体的合成一般比不对称合成要简便许多，并且在多数情况下采用拆分法可以得到符合药用要求的高纯度的手性异构体产品，手性拆分依然是目前制药工业中最常用的方法。对于存在两个以上手性中心的非对映异构体来说，其理化性

质差异较大，可以按常规的方法进行分离纯化；而对于对映异构体，由于其除旋光方向相反外，其他理化常数如溶解度、极性、沸点、熔点等大都相同或非常接近，因此很难用常规的重结晶等方法进行分离纯化。手性拆分可以分为化学方法和物理方法两大类。

物理方法是获得单一异构体手性物质最早的方法之一。1847 年法国微生物学家、化学家巴斯德首次在放大镜的帮助下，用镊子分离了酒石酸铵钠复盐的对映异构体，但这类拆分方法一般由于无法实现工业化而缺乏实用性。少数对映异构体混合物可采用对映体过量结晶法或优先结晶法，通过交替循环，得到单一手性异构体，例如氯霉素外消旋混合物（合霉素）的工业拆分就是采用的这种方法。但目前还缺乏可靠的理论预测什么样的化合物可以采用该方法进行有效的拆分，因此其应用存在较大的局限性，其机制有待于进一步阐明。另外一种物理拆分是色谱法，即采用含有不对称因素的吸附剂或流动相，进行手性异构体的分离。众所周知，色谱法是分离能力最强的分离方法之一，但由于该方法通常溶剂和吸附剂用量大、生产效率低、成本高，不适合在工业上用于大量制备。近年发展的模拟移动床色谱（simulated moving bed chromatography，SMB）技术，通过采用多根色谱柱首尾相接成为一闭环系统，并进行柱间的程序性切换，从而了实现固定相与流动相之间的反向流动效果，可实现连续进样并同时获得两个高纯手性异构体产品，并且大大节省溶剂和吸附剂，减少人工的消耗。该技术使得手性药物的色谱分离由分析型转向制备型成为现实，对手性药物的分离具有重要意义。目前模拟移动床色谱分离技术已成功用于如左乙拉西坦等手性药物的工业化生产，一套生产装置每年能够生产高达数十吨的手性纯药物。尽管模拟移动床色谱分离技术有这么多的优点，但如何寻找价格低廉、使用寿命长的手性吸附剂，以及如何通过数学模型和实验数据优化分离参数等，仍然有许多令人棘手的问题需要解决。

化学拆分法是目前工业上最成熟、使用最广泛的获得高纯度手性药物的方法。例如采用酒石酸、樟脑磺酸、苹果酸等手性酸与外消旋的胺类物质反应形成非对映异构体盐，或者反过来以手性纯的 α-苯乙胺、奎宁等天然生物碱与外消旋的酸类物质反应形成非对映异构体盐，然后利用非对映异构体的溶解度差异，通过若干次重结晶而得到高纯度的单一异构体盐，经过酸碱处理游离后，可以得到符合药用要求的高纯度的单一手性异构体物质。除成盐外，对于不含酸碱性的化合物，也可以通过共价键形成非对映异构体，经拆分后再脱去引入的手性辅助基团而得到高纯度的单一手性异构体物质。例如，在合成的外消旋黄烷酮分子中通过与手性纯的 α-苯乙胺反应得到非对映体西夫碱，拆分后水解而分别得到与天然产物构型相同的左旋体松属素（pinocembrin）及其右旋对映体。基于超分子理论的包结拆分法也类似于化学拆分。采用化学法拆分面临的主要问题是如何

找到合适的成盐和重结晶系统，提高分离形成的非对映异构体的效率。利用酶（如脂肪酶、青霉素酰化酶等）或微生物对手性异构体转化的高度选择性拆分外消旋混合物，也是近年来手性拆分研究的热点之一。

不对称手性药物的合成和纯化已成为药物化学研究中一个极为重要的发展方向。包括我国在内的许多国家的药政部门也已加强了对手性药物的管理，制定了有关手性药物研究的技术指导原则和要求。因此，解决不对称手性药物的合成和纯化关键技术问题，不仅具有重要的理论意义，同时具有重大的实用价值。

参考文献

Blaser HU ,Schmidt E. 2004. Asymmetric Catalysis On Industrial Scale-Challenges , Approaches And Solutions. New York : John Wiley & Sons Inc

Grill C ,Miller L ,Yan T Q. 2004. A comparison of preparative HPLC ,steady state recycling ,and simulated moving bed. J Chromatogr A ,1026 (1～2) : 101～108

Katasuki T , Sharpless KB. 1980. The first practical method for asymmetric epoxidation. J Am Chem Soc ,102 : 5974～5976

Knowles W S. 1983. Asymmetric hydrogenation. Acc Chem Res ,16 : 106～112

Miyashita A , Yasuda A , Takaya H , et al. 1980. Synthesis of 2 , 2′-*bis* (diphenylphosphino)-1 , 1′-binaphthyl(BINAP) , an atropisomeric chiral *bis*(triaryl)phosphine , and its use in the rhodium(I)-catalyzed asymmetric hydrogenation of α-(acylamino)acrylic acids. J Am Chem Soc , 102 : 7932～7934

Tu Y , Wang ZX , Shi Y. 1996. An efficient asymmetric epoxidation method for *trans*-olefins mediated by a fructose-derived ketone. J Am Chem Soc ,118 : 9806～9807

Yuan Y , Yang QY , Tong YF , et al. 2008. Synthesis and enantiomeric resolution of (±)-pinocembrin. Journal of Asian Natural Products Research ,10 (10) : 999～1002

撰稿人：吴　松
中国医学科学院药物研究所

药物多晶筛选与临床安全有效性

Pharmaceuticals Polymorphism Screening Toward Clinical Safety and Efficacy

在固体给药形式中活性原料药由于结晶条件的差异，形成多种晶型的现象，称为药物的多晶现象（polymorphism）。按照现代药物物理学分类，药物的多晶现象既包括药物的晶体形态与无定形态，也包括溶剂合物或者水合物，同时也包括共晶化物等新型结晶形态。同一药物的不同多晶形态可能具有显著不同的理化特性、稳定性及生物利用度差异，将直接关系到药物的临床安全有效性。一个典型案例是美国雅培公司开发的治疗艾滋病药物——利托那韦（ritonavir），在上市 18 个月后，活性原料药的晶型发生了转变，从原来的晶型Ⅰ转变为晶型Ⅱ。研发人员发现晶型Ⅱ的热力学稳定性更好，但是溶解度只有晶型Ⅰ的一半，不仅使得患者的临床疗效下降，而且增加了对该药物安全性的担忧。作为一个严重教训，从此国外药业公司不得不在研发过程中充分重视药物多晶现象的研究，纷纷投入巨资和人力对其开发的化学药物进行晶型筛选研究，以全面掌握药物的晶型状态，然后通过选择合理的药用晶型，尽可能保证晶型药物在临床使用中的安全有效性。由此可见，在药物的研发进程中，包括早期筛选、生产放大及上市阶段，如何有效筛选一个药用晶型，并且自始至终保证晶型的稳定性，避免意外晶型的不可控出现，将是一个关乎药物临床安全有效性的关键问题。

药物的多晶筛选是一个集制备、分析表征与临床评价于一体的多元过程，其目的就是寻找具有成药特性的多晶形态。药物的多晶筛选过程综合评价了不同晶型间化学、物理、药学等特性，是保证晶型药物临床安全有效性的重要物质基础。药物多晶型制备与诸多因素相关，包括溶剂类型、温度、搅拌速率、种晶、溶液过饱和度等。虽然在特定的条件下，通常只有一种晶型在热力学上是稳定的，但是在结晶过程中，由于动力学生长优势，具有较高自由能的亚稳态晶相往往较早获得，随后才出现更稳定的晶型。随着放置时间的延长，亚稳态晶型将逐渐转变为具有较低自由能的稳态晶型，这个转变过程可能非常缓慢。为了保证药物在货架储存期间和临床期间的晶型可控性，需要充分了解不同晶型的热力学性质和互变关系。通常选择稳态晶型，这样可以避免转晶风险的发生。但是有时候出于亚稳态晶型具有较好的溶解性和生物利用度的考虑，也不排除使用亚稳态的晶型。所以只要满足储存和临床使用的稳定可控性要求，无论稳态晶型或者亚稳

态晶型都可能被选择为药用晶型。

在新药研发过程中，由于人们无法准确预知特定晶型的可获得性与成药性，因此需要通过尽可能宽地选择能引起晶型多样性变化的多元参数来实现晶型的筛选。目前正由小批量人工传统结晶技术向大规模的高通量筛选技术发展，并通过计算机辅助手段开展晶型预测。另外，正探索毛细管结晶、激光诱导结晶及共结晶等技术用于药物多晶型的筛选研究，其中共结晶技术还开创了一条产生具有独特性质（如联合治疗）的药物晶型及获得知识产权保护的新途径。

晶型的分析表征手段包括 X 射线粉末衍射法（X-ray powder diffraction，XRPD）、差示扫描量热分析法（differential scanning calorimetry，DSC）、热重分析法（thermogravimetry ，TG）、熔点法（MP）、溶解度测试、偏光显微镜法、红外光谱法（infrared spectroscopy，IR）、拉曼光谱法（Raman spectroscopy）、固态核磁法（solid-state nuclear magnetic resonance，ssNMR）及动态蒸汽吸收测定法（dynamic vapor sorption，DVS），其中 XRPD、IR、DSC、熔点法和溶解度测试手段常用于反映晶型的物理特性，而采用 TG 或者 DVS 等表征手段能考察溶剂合物或者水合物的结合状态，并对判断晶型的稳定性具有重要价值。对于不同的药物晶型，需要根据化合物的自身特点，选择专属性的晶型检查方法，并根据试验结果制订合理的限度以控制有效药用晶型的含量或无效晶型的含量，保证晶型药物各个批次之间的一致性，有助于保证临床上晶型药物的安全有效性。

在制剂过程中可能因制剂工艺（温度、溶剂、压力）及与辅料相容与否而可能发生活性原料药的晶型改变。由于制剂通常含有大量的辅料背景，给表征活性原料药的晶型带来了一定的挑战。通过模拟制剂工艺和模拟样品，采用适当的方法可以实现制剂中活性原料药的晶型表征，据此可以掌握制剂工艺对晶型的影响因素，从而合理筛选处方工艺，保证药用晶型的质量可控性和相应的临床疗效。目前各国药典对涉及晶型差异的制剂质量评价，较多采用溶出度试验法，这样通过模拟体内环境的溶出数据反映晶型特征和生物利用度，保证晶型药物的安全有效性。

综上所述，出于药物的临床安全有效性管理要求，药物多晶型的筛选是药物研发过程中的关键研究内容。与欧美发达国家的药物企业研发水平相比，国内制药研发企业对晶型药物的研究尚处于朦胧状态，很少有意识地关注晶型多样性的系统筛选，也缺少相关质量标准规范。这种现状实际上已经制约着我国化学药物的发展和药物质量的提高，成为影响用药安全性和有效性的重要因素。为了改变现状，不仅需要发展现代药物晶型筛选技术，而且需要从药物评价管理制度着手，从法规审批等方面予以积极引导，以提高我国晶型药物的安全有效性。

参 考 文 献

Aaltonen J, Alles M, Mirza S, et al. 2009. Solid form screening—a review. Euro J Pharm Biopharm, 71: 23～37

Bernstein J. 2002. Polymorphism in Molecular Crystals. Oxford: Oxford University Press

Chemburkar SR, Bauer J, Deming K, et al. 2000. Dealing with the impact of Ritonavir polymorphs on the late stages of bulk drug process development. Org Proc Res Dev, 4: 413～417

Datta S, Grant DJW. 2004. Crystal structures of drugs: advances in determination, prediction and engineering. Nature, 3: 42～57

Haleblian J, McCrone W. 1969. Pharmaceutical applications of polymorphism. J Pharm Sci, 58: 911～929

Li HT, Kianga YH, Jona J. 2009. Multiple approaches to pharmaceutical polymorphism investigation—a case study. Euro J Pharm Sci, 38 (5): 426～432

Stephenson GA, Forbes RA, Reutzel-Edens SM. 2001. Characterization of the solid state: quantitative issues. Adv Drug Deliv Rev, 48: 67～90

Yu X, Lionberger RA, Raw AS, et al. 2004. Applications of process analytical technology to crystallization processes. Adv Drug Deliv Rev, 56: 349～369

撰稿人：陈东英
中国科学院上海药物研究所

药物溶解度的早期预测与解决方法

Early Prediction of Drug Solubility and Corresponding Solutions

1. 背景

物质溶于水对化学和生物学而言是一个最基本的过程，药物分子要发挥一定的药效，它首先必须被运送到其作用的位点，而这几乎完全是在水溶液中进行的。药物要在体内发挥其生理作用主要依赖于其在水中的溶解度，药物的溶解度决定了其吸收、分布、代谢、排泄等化学特性，合适的溶解度才能有较好的药代动力学性质以保证其药效。因此，在药物研发中，药物溶解度被认为是最根本、最重要的理化性质之一。很多候选药物都曾遭遇溶解度问题，使药物的使用、代谢和疗效受到影响，影响了药物研发的进程，甚至导致最终的失败。据估计，有高达 40% 的药物因为溶解度而造成药代动力学性质差而被放弃，最终不能成为药物。因此，在药物研发中将溶解度问题提至药物研发的早期阶段，如在化合物进行生物活性评价和机制研究前考虑，这样可降低药物研发的风险，大大提高药物研发的成功率。所以药物溶解度的早期预测，是药物研发中一个备受关注的问题。

2. 科学意义

药物溶解度最广泛的定义是指在一定温度下，在一定体积的溶剂中达到饱和时溶解的最大药量，它是反映药物溶解性的重要指标，也是药物能否有效吸收的关键因素之一。药物溶解度是在药物研发中必须关注的首要问题之一，许多药物都是有机化合物，往往难溶于水，有的即使是其饱和溶液也难达到有效的治疗浓度，因而被淘汰。因此，在新药的开发过程中，溶解度早期预测研究无论对于早期先导化合物筛选，还是选择合适的候选化合物进入临床前及临床开发都起着重要的作用。通常，要测得准确可靠的药物溶解度数据，需要采用昂贵、费时的实验方法，如摇瓶法、电位法、动力学法等。即便如此，测得的难溶性药物的溶解度数据也可能会有 3～5 倍甚至数量级的差异。因此，人们对药物溶解度早期预测提出了新的解决方法，即应用药物分子的某些物理常数，通过计算方法来快速简捷地预测其溶解度，这对药物溶解度早期预测具有明显的实用意义和研究价值。

3. 最新进展

药物溶解度作为药物口服吸收预测和候选药物后续开发评估的关键性物理化

学性质之一。在过去的数十年中，人们致力于通过计算的方法对药物溶解度进行早期预测，已发展了多种药物溶解度预测模型，并取得了显著的进展。当前已建立起多种关于药物溶解度的预测模型，根据所采用的描述符可分为：量子力学/半经验量子力学模型、分子碎片模型、分子拓扑指数和电子态指数模型，主要是通过统计学方法建立起这些描述符与溶解度的线性和非线性模型，其中多以多元线性回归和人工神经网络等统计学方法建模。线性回归模型和固定基团贡献方法预测药物溶解度具有预测速度快等特点，可用于大量化合物溶解度的预测。而人工神经网络模型有着非线性建模的优势，对复杂或柔性化合物的溶解度预测在一定程度上具有较好的准确性。近几年来药物溶解度早期预测研究主要集中在算法和训练集的改进方面，对数据集中化合物的溶解环境给予了更多限制（温度298K、非缓冲溶液），使其与体内溶解环境更为接近，采用了几百个有机小分子、药物和类药化合物作为训练集，通过遗传算法筛选变量与多元线性回归建模，并使用了临床药师手册（PDR）和综合药物化学数据库（CMC）中的上千个化合物对模型进行了验证，验证表明建立的药物溶解度预测模型已经具备了一定的应用价值。

4. 主要难点

药物的溶解度早期预测方法研究已有几十年的历史，一直以来都是研究的热点之一，虽然有着各种各样的线性和非线性的溶解度预测模型，但由于药物分子一般具有复杂的结构，药物分子和液体分子间距较小，分子间相互作用比较复杂，药物溶解度的测定和理论预测比气-液、液-液体系困难得多。目前已发展的这些药物溶解度预测方法都存在着一定的缺陷，对药物溶解度进行预测时有着较大的误差，其产生误差的主要原因可能在于所选用的物理性质不能反映药物的结构特点；或所选物理性质依据的结构与药物的实际结构不符（如互变异构）；药物处于所选用的物理性质的范围以外等。由于影响药物溶解度的因素众多，而且对不同药物影响因素又不尽相同，因此经验预测法通常在一定范围内使用，可以得到相当的准确度，但如果范围推广了，其准确性就会降低。有些预测方法尽管能给出比较满意的预测结果，但是由于其耗费时间较长，药物研发过程中很难应用于对大量样本的预测。现有的这些经验性预测方法在药物研发过程中还没有得到人们充分的认可和广泛的应用，加上近年来合成了大量的新药物，而相应的药物溶解度数据相当缺乏，使得通过计算方法对溶解度进行准确预测仍然存在着很大的困难，同时人们对溶解度的理论研究还不够深入，也大大限制了药物溶解度早期预测领域的发展，这些都有待进一步解决。

5. 展望

真正具有实际应用价值的药物溶解度预测方法，应该是从药物分子结构出发就能对溶解度进行合理的准确预测，而无须任何实验性参数，并且其准确性必须

通过大量复杂结构化合物所验证，最好其预测方法还具有简单、快捷等特点，便于对数量巨大的小分子化合物库迅速进行水溶性评估。从已建立起的各种预测方法来看，基于统计学分析发展起来的一些方法很难获得对药物溶解度的准确预测，所以今后在建立预测模型中可使用一些非统计学方法，还应考虑药物分子的溶剂化效应等一些影响因素，以进一步提高溶解度预测的水平。另外，溶解度早期预测的准确性在一定程度上还依赖于高质量的药物溶解度数据，因此提高溶解度数据质量也有助于提高预测模型的准确性，这些都是未来药物溶解度早期预测研究努力的方向，以期获得满意的预测结果。

参考文献

Bhattachar SN, Deschenes LA, Wesley JA. 2006. Solubility: it's not just for physical chemists. Drug Discov Today, 11(21～22): 1012～1018

Dai W, Pollock-Dove C, Dong LC, et al. 2008. Advanced screening assays to rapidly identify solubility-enhancing formulations: highthroughput miniaturization and automation. Adv Drug Delivery Rev, 60(6): 657～672

Di L, Kerns EH. 2006. Biological assay challenges from compound solubility: strategies for bioassay optimization. Drug Discov Today, 11(9～10): 446～451

Han van de Waterbeemd, Bernard Testa. 2009. Drug Bioavailability: Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability. Weinheim: Wiley-VCH

Hewitt M, Cronin MT, Enoch SJ, et al. 2009. In silico prediction of aqueous solubility: the solubility challenge. J Chem Inf Model, 49(11): 2572～2587

Johnson SR, Zheng W. 2006. Recent progress in the computational prediction of aqueous solubility and absorption. AAPS J, 8(1): E27～40

Jorgensen WL, Duffy EM. 2002. Prediction of drug solubility from structure. Adv Drug Delivery Rev, 54(3): 355～366

Mannhold R. 2008. Molecular Drug Properties. Measurement and Prediction. Weinheim: Wiley-VCH

Stegemann S, Leveiller F, Franchi D, et al. 2007. When poor solubility becomes an issue: from early stage to proof of concept. Eur J Pharm Sci, 31: 249～261

Taskinen J. 2000. Prediction of aqueous solubility in drug design. Curr Opin Drug Discov Devel, 3: 102～107

撰稿人：陈亚东　陆　涛
中国药科大学

复杂天然化合物的立体结构

Stereo-Chemistry of Complex Natural Products

天然化合物的立体结构是描述其组成原子在特定化学环境下的空间排列和位置，其含义包括相对构型、绝对构型和构象。化合物的构象与其存在状态、介质和温度等有关，同一化合物可同时存在多种构象。复杂结构天然化合物精细立体结构的研究是天然产物化学研究中最具挑战性的工作，也是限制快速发现活性天然化合物的“瓶颈”之一。具有重要生物活性的天然化合物（包括内源性生物活性物质）在生命过程中发挥着不可缺少的调节和介导作用，对人类的生存、繁衍和健康至关重要。这种生物调节和介导作用与活性天然化合物立体结构（相对和绝对构型）和在介质中构象密切相关。因此，正确认识复杂结构天然化合物（包括内源性物质）的相对和绝对立体结构，以及在溶液中的构象等精细立体结构，对有机合成化学、药物设计、研究药物分子与靶标的相互作用，以及解释生命过程中的一些重大问题都具有重要的科学意义。

随着波谱技术的迅速发展，特别是磁共振（NMR）技术、X 射线单晶衍射、圆二色谱，以及化学方法的综合应用，使得一些复杂天然产物的精细立体结构能够在较短的时间内被确定。磁共振技术是天然产物结构鉴定中最常用的手段之一，包括^{1}H和^{13}C-NMR 等一维波谱和各种二维 NMR 技术。特别是近年来，2D-NMR 技术在结构解析中凸显出重要作用。2D-NMR 包括两种类型，一种是通过共价键的标量偶合，另一种是通过空间的偶极相互作用，又叫 NOE 效应。前者能够提供核与核之间的连接关系，如^{1}H-^{1}H COSY、HMQC 和 HMBC 谱，为确定分子的平面结构提供信息；而后者则是通过检测核与核之间的空间偶极相互作用，如 NOESY 和 ROESY 技术，能够提供分子的立体化学信息，是认识分子相对立体构型、构象和分子运动的重要手段。

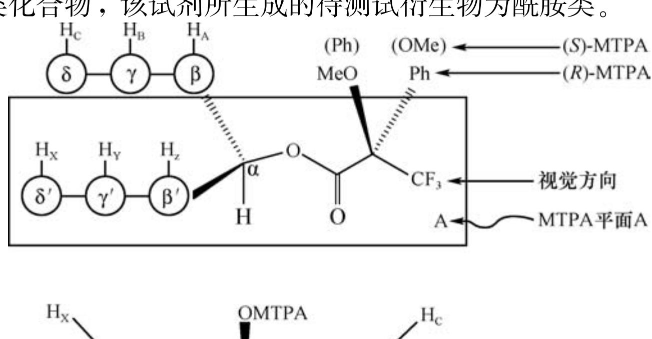
在复杂天然化合物的相对构型确定中，对于环系具有刚性或在溶液中存在优势构象的天然化合物，一般情况下，根据^{1}H-NMR 中质子的偶合常数、NOESY（ROESY）谱中的信号相关及 NOE 差谱等，便可确定其相对立体构型和在溶液中的优势构象。而对链状和具有大环结构的化合物，由于链状化合物的自由旋转和大环化合物的环系反转，便无法利用质子的偶合常数和 NOESY 谱中的相关信号等确定其相对构型。近年来，磁共振技术、计算方法和磁共振数据库的联合应用，特别是基于偶合常数的构型分析（*J*-based configurational analysis），解决

了一系列多羟基大环内酯和多羟基链状化合物的相对构型。对链状和大环结构的化合物，化学方法仍是非常有效的手段，经过化学降解和转化，与已知结构或片段沟通，往往会得到可靠的结果。例如，裂环千斤二萜 lathyranoic acid A 相对构型的确定，便是最好的范例。当然，X 射线单晶衍射也是最有力的手段之一，但对大多数天然化合物而言，很难得到质量符合要求的晶体。

对复杂天然产物的绝对构型确定，圆二色谱（circular dichroism，CD）、旋光光谱（optical rotatory dispersion，ORD）、Mosher 方法、X 射线单晶衍射是目前常用的手段。在以上方法的应用受到限制或不适用时，化学沟通和全合成研究便是确定绝对构型最经典和权威的方法。由于篇幅所限，这里只重点介绍圆二色谱和 Mosher 方法。

旋光谱和圆二色谱法：应用手性光学方法测定化合物绝对构型，最常应用的是旋光光谱和圆二色谱，其所显示的 Cotton 效应与分子的手性密切相关，认识 Cotton 效应与分子手性之间的关系，便可确定一些含特定官能团化合物的绝对构型。也可选用立体结构相似或相反的模板化合物与其比较，以确定绝对构型。对于一些特定类型的化合物，有许多经验规则可用，如适用于饱和环酮的八区律和内酯的扇形规则等。CD 激子手性法（exciton chirality method）是一测定有机化合物绝对构型既方便又可靠的方法，近年来应用非常广泛。特别是将 CD 激子手性法和基于量子化学的计算 ECD 或 VCD 相结合，显示了良好的效果，即通过将实验结果和计算结果进行比较，从而确定复杂天然产物的结构，两种方法可相互验证，这方面成功应用的例子越来越多。

Mosher 方法：以 α-甲氧基-α-三氟甲基苯乙酸（MPTA）酯形式的 Mosher 方法最为常用，适用于测定含仲醇基团化合物的绝对构型（图 1）。PGME（phenylglycine methyl ester）也是测定化合物绝对构型的重要试剂，适用于测定 α-位双取代的羧酸类化合物，该试剂所生成的待测试衍生物为酰胺类。



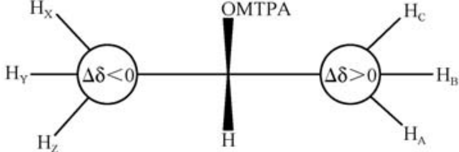


图 1　Mosher 法测定仲醇绝对构型的模型

无论是利用圆二色谱或 Mosher 方法，都必须深刻地了解其适用范围和限制性的前提条件，否则将可能得到错误的结果。对于 CD 激子手性法，在分子存在多个发色基团时，应根据紫外吸收和 CD 谱，正确判断所产生激子偶合的两个发色基团以及它们的空间关系，以便得出正确的构型。有关 Mosher 方法，首先要分析该方法是否适用于待测定的分子。在此前提下，进行构象分析，找到正确的 Mosher 平面，再利用（*R*）-MTPA 酯和（*S*）-MTPA 酯，或（*R*）-PGME 酰胺和（*S*）- PGME 酰胺的^{1}H-NMR 谱数据进行绝对构型的确定。

虽然伴随着物理学和化学研究方面的理论和技术的许多革命性发展，使得对复杂天然化合物立体结构的研究有了长足的进步。但是在现有条件下，仍然有许多立体结构的难题没有得到圆满的解决。未来在这方面的研究，除了完善和综合利用以上理论和技术外，研究的重点应该集中在解决以下立体结构的难题，以寻求理论和技术的新突破。对于这些分子结构而言，以上所涉及的理论和技术的应用受到限制。今后研究的重点内容包括：①研究柔性分子（包括链状分子、大环体系和结构局部自由旋转的分子体系等）的立体结构和构象；②寡质子分子和特殊环系（包括表征立体结构的关键部位无质子、杂环类、非椅式六元环系等，限制了 ROESY 等技术的有效应用）的立体结构和构象；③大分子体系，如多糖和蛋白质等的立体结构和构象。

参考文献

Berova N, Nakanishi K, Woody RW. 2000. Circular Dichroism: Principles and Applications. 2nd ed. New York: Wiley-VCH, 337～382

Bifulco G, Dambruoso P, Gomez-Paloma L, et al. 2007. Determination of relative configuration in organic compounds by NMR spectroscopy and computational methods. Chem Rev, 107: 3744～3779

Ding YQ, Li XC, Ferreira D. 2007. Theoretical calculation of electronic circular dichroism of the rotationally restricted 3,8″-biflavonoid morelloflavone. J Org Chem, 72: 9010～9017

Kwan EE, Huang SG. 2008. Structural elucidation with NMR spectroscopy: practical strategies for organic chemists. Eur J Org Chem, 2671～2688

Liao SG, Zhan ZJ, Yang SP, et al. 2005. Lathyranoic acid A: first secolathyrane diterpenoid in nature from euphorbia lathyris. Org Lett, 7: 1379～1382

Ohtani I, Kusumi T, Kashman Y, et al. 1991. High-field FT NMR application of Mosher's method. The absolute configurations of marine terpenoids. J Am Chem Soc, 113: 4092～4096

Silverstein RM, Webster FX, Kiemle D. 2005. Spectrometric Identification of Organic Compounds. 7th ed. New York: Wiley-VCH, 1～512

Stephens PJ, Pan JJ, Devlin FJ. 2007. Determination of the absolute configurations of natural products via density functional theory calculations of vibrational circular dichroism, electronic circular dichroism and optical rotation: the schizozygane alkaloid schizozygine. J Org Chem,

72：2508～2524

Stephens PJ, Pan JJ. 2007. Determination of the absolute configurations of pharmacological natural products via density functional theory calculations of vibrational circular dichroism: the new cytotoxic iridoid prismatomerin. J Org Chem, 72: 7641～7649

Yabuuchi T, Kusumi T. 2000. Phenylglycine methyl ester, a useful tool for absolute configuration determination of various chiral carboxylic acids. J Org Chem, 65: 397～404

撰稿人：岳建民
中国科学院上海药物研究所

水溶性天然化合物的分离和结构

Isolation and Identification of Hydrophilic Natural Products

药物发现阶段的一个重要研究内容是化合物库的建设，不断扩充的化合物库的内涵包括质和量两个概念，量是化合物的数量，而质是化合物的类药性（drugability），质的提高对药物发现效率的提高具有更重要的意义，Lipinski的"Rule of Five"法则很好地阐明了这一点。水溶性天然化合物是指相对于天然产物中有着广泛研究的脂溶性成分而言的极性较大的次级代谢产物。天然药物资源，尤其是中药的民间运用特点（如水煎）说明其中的水溶性成分是其重要的药理作用物质基础，在临床上有着广泛使用的中药注射剂更是以其水溶性成分为其确切疗效的保证。近年来方兴未艾的海洋天然产物，由于大多数次级代谢产物是作为海洋中缺乏有效的物理防御机制的海洋生物的化学防御物质分泌至海水中来抵御天敌的侵害，水溶性是其基本的理化性质特点。这一切说明水溶性天然化合物具有更好的类药特点。

随着现代分离技术和波谱技术（如LC-MS、LC-NMR等联用技术）的迅猛发展，制约天然产物研究的分离和结构解析的因素日益消除，尽管如此，天然产物的结构多样性和复杂性以及与之相关的理化性质的差别决定了没有一种通用技术可以彻底解决天然产物研究的分离、分析问题，天然产物的分离、分析还是无法跟上生物学研究的快速发展步骤。水溶性天然产物的分离和结构鉴定就是其中的难题之一。此外，通常认为药物靶点是水溶性蛋白质中的脂溶性口袋的观点也使得人们对于水溶性天然化合物鲜于挖掘。两方面的原因使得水溶性天然化合物成了当今亟待开发的天然活性化合物资源。

相对于脂溶性成分，水溶性化合物稳定性较差、易被硅胶吸附破坏、和无机盐及大分子（糖、蛋白质、多肽等）处在相同的极性区域、含量更低、骨架特异、波谱信号重叠复杂等一系列特点使得水溶性成分的分离和结构鉴定极具挑战性。

水溶性成分的分离需要排除多种因素的干扰。普遍较差的稳定性使得水溶性成分的研究需要采用更为温和的分离条件，否则，分离获得的往往是其降解产物，无法反映原药材的药理活性特点。无机盐的存在，这在海洋天然产物研究中尤其明显，使得活性跟踪无法顺利进行。大分子的干扰使得含量相对较少的小分子成分被掩盖，而且即使微量的大分子残留在中药制剂中都会对安全性产生不可

忽略的影响，频发的中药注射剂不良反应事件的一个重要因素就是导致过敏反应的大分子杂质的存在。硅胶的高吸附性和弱酸性使得水溶性成分在分离过程中损失巨大，而水溶性成分在天然药物资源中的含量甚微，特别是在海洋天然产物的研究中，资源稀少，作为关键活性成分的水溶性成分含量极低，两方面的因素使得这类成分最终无法阐明，偏离了海洋天然产物研究的最基本前提。采用硅胶进行天然产物分离研究的案例中，经常会遇到活性跟踪中断的例子，一个重要的原因就是具有活性的微量水溶性成分被吸附消除或被降解为无活性的产物。水溶性成分的分离难度使得在对天然药物资源的研究过程中往往将这些成分忽略了，甚至直接放弃了天然药物资源中最重要的一部分。

水溶性成分的分离难度也直接影响了其结构鉴定。水溶性的特点使得无法通过结晶等手段获得高纯度的样品，在对化合物绝对构型的鉴定中无法采用 X 射线单晶衍射的分析。纯化的化合物量甚少（微克级），使得波谱分析的难度大大增加，即使完成了结构鉴定，也无法保证下一步的活性研究样品量。水溶性成分的结构解析同样具有不同于脂溶性成分的特点。除了常见的分子质量较小的水溶性化合物的结构鉴定比较简单外，由于前期研究较少，大多化合物的鉴定无法借鉴前人研究的结果。许多水溶性成分是不同结构单元的缩合产物，分子中含有较多的芳香骨架，在波谱中如 NMR 中由于屏蔽或去屏蔽效应的存在，使得化学位移信号异常，相似结构单元缩合而成的结构特点使得信号重叠，无法区分，多取代的特点使得^{1}H-NMR 简单，但^{13}C-NMR 信号重叠，无法通过^{1}H-^{13}C COSY 等二维谱技术来确定骨架连接，往往需要通过化学降解来获得结构片段的信息。

技术的困难和长期以来对药物靶标的水溶性结合位点认识的忽略导致该领域的研究薄弱甚至直接放弃，是天然药物化学研究的一个巨大损失。一方面忽略了一个重要的活性化合物资源，更使得中药药理作用物质基础的阐明欠缺了重要的一环，而离开了明确的药理作用物质基础，一切后续的提高和发展更无从谈起，使之成了科学难题。

由此可见，水溶性天然产物的分离和结构鉴定是充分挖掘我国丰富的天然药物资源宝库，提高和发展我国中药研究和产业水平，乃至创新药物研究迫切需要跨出的一步。近年来，随着分离和结构鉴定技术的不断发展，对该领域研究重要性的认识不断提高，提供了解决该难题的可能性。如各种原来用于大分子成分（蛋白质、多糖）研究的反相层析担体可以克服硅胶的高吸附、降低分离过程的损失，LC-MS^{n}、LC-NMR 等联用技术，可以快速地从提取物中直接获得化合物的结构信息，高磁场的 NMR、超导低温探头可以对微克级的样品进行波谱分析，高通量、高内涵筛选、虚拟筛选等技术使得活性研究更符合微量成分研究的需求。不断深入的研究也使得对一些化合物有了新的认识，如丹宁类（tanni-noids）化合物，长期以来，该类成分由于普遍存在易和蛋白质结合的性质，被

认为是中药中非特异性作用成分而抛弃，在活性筛选中由于自身的紫外吸收干扰而特意设置一个除丹宁的步骤。近年来发现该类成分并非如此，在抗肿瘤、抗 HIV 等领域，该类成分显示良好的活性，从而引起了大家对其重新认识的兴趣，FDA 于 2006 年批准的目前唯一的天然药物就是以小分子丹宁（EGCG）为主要成分的茶多酚提取物。而我国传统中药中，特别是列为上品的中药中，大多含有丰富的多酚性的水溶性成分。近年来尽管临床疗效显著但不良事件频发的中药注射剂更是以水溶性成分为有效成分，这些成分的阐明既是水溶性天然化合物研究的一个突破口，将是天然药物化学研究的一个重要方向，也是我国中药现代化研究（如中药注射剂的药用物质基础的阐明等）的迫切需要。此外，水溶性活性天然化合物的阐明以及进一步的作用机制和靶蛋白的研究也将为药物新靶标的发现和验证开辟新的思路。

参考文献

Bugni TS, Richards B, Bhoite L, et al. 2008. Marine natural product libraries for high-throughput screening and rapid drug discovery. J Nat Prod, 71: 1095～1098

Butler MS. 2008. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. Nat Prod Rep, 25: 475～516

Drewry DH, Macarron R. 2010. Enhancements of screening collections to address areas of unmet medical need: an industry perspective. Current Opinion in Chemical Biology, 14: 289～298

Ebada SS, Edrada RA, Lin WW, et al. 2008. Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. Nature Protocols, 3: 1820～1831

Ernst B, Magnani JL. 2009. From carbohydrate leads to glycomimetic drugs. Nat Rev Drug Discovery, 8: 661～677

Korfmacher WA. 2005. Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. Drug Discovery Today, 10: 1357～1367

Li JW, Vederas JC. 2009. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier. Science, 325: 161～165

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, et al. 1997. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Adv Drug Delivery Rev, 23: 3～25

Newman DJ, Cragg GM. 2007. Natural products as a source of new drugs over the last 25 years. J Nat Prod, 70: 461～477

撰稿人：宣利江

中国科学院上海药物研究所

选择性：天然产物结构修饰的关键

Selectivity：Key Problem in Modification of Natural Products

天然产物是指动物、植物、微生物的次生代谢产物（secondary metabolites）。人类的生存离不开天然产物，天然产物为人类提供了化学品、香料等重要原料，更重要的是提供了药物发现的化合物、药物生产的重要原料。人们最早使用的药物大多是天然产物的混合物。从1806年德国科学家Sertümer从鸦片中得到鸦片碱单一成分作为药物至今，许多药物直接或者间接来自天然产物。抗肿瘤药物及抗感染药物约50%直接或者间接来源于天然产物。

天然产物作为药物发现的源泉或者作为药物生产的原料优点突出，这主要有如下的原因：人们利用动物、植物、微生物作为药物有相当长的历史，利用所获得的经验、临床线索，可以避免药物筛选的盲目性；生物种类及存在的环境丰富多样，据估计生物种类有500万～1000万种，目前已标识的达到200多万种。因此，天然产物异常丰富，结构极具多样性；天然产物的分离、纯化、鉴定方法发展迅速，各种活性评价手段日新月异，从天然产物发现药物的效率逐步提高。正是因为天然产物结构的多样性，为各种疾病预防与治疗药物的发现提供了物质基础；许多天然产物来源丰富，人们可以通过植物栽培、动物养殖、微生物发酵来大量、廉价地获取，适合药物的生产。

天然产物骨架结构作为药物先导物发现有其特点，但是天然产物成为药物需要结构修饰。一方面是为了研究结构与活性的关系、提高活性、降低毒性、改善理化性质等目的需要进行结构修饰；另一方面，许多时候具有活性的成分含量不高，但是在其来源生物体内或者相关生物体内结构相似的成分含量高，通过相似成分的结构改造制备活性成分是一个重要的手段（图1）。

天然产物的结构修饰是药物发现、药物生产、资源综合利用的途径，但是天然产物结构修饰中存在效率低、成本高、污染重、过程复杂等关键问题。许多因素与这些关键问题有关，包括各种键型的形成方法，各种骨架结构的转化方法，饱和碳的活化等。其中一个最主要的因素是结构修饰中的选择性。选择性主要涉及三类：化学选择性（chemoselectivity）、区域选择性（regioselectivity）和立体选择性（stereoselectivity）。分子中有多个活性官能团，但只需要其中之一起反应，这就是化学选择性问题。区域选择性是指在化学反应中一个键断裂或者形成优先于其他可能键断裂或者形成的情况。立体选择性也是一种化学反应的特征，

指一个化合物的非立体专一（non stereo-specific）的反应中，形成一个新的手性中心或者已有的手性中心转化后得到不均等的立体异构体的反应性。选择性的实现既有科学的问题，也有技术的问题。从根本上实现选择性必须对化学反应与手性的本质、化学键形成的动态过程等有彻底的了解。

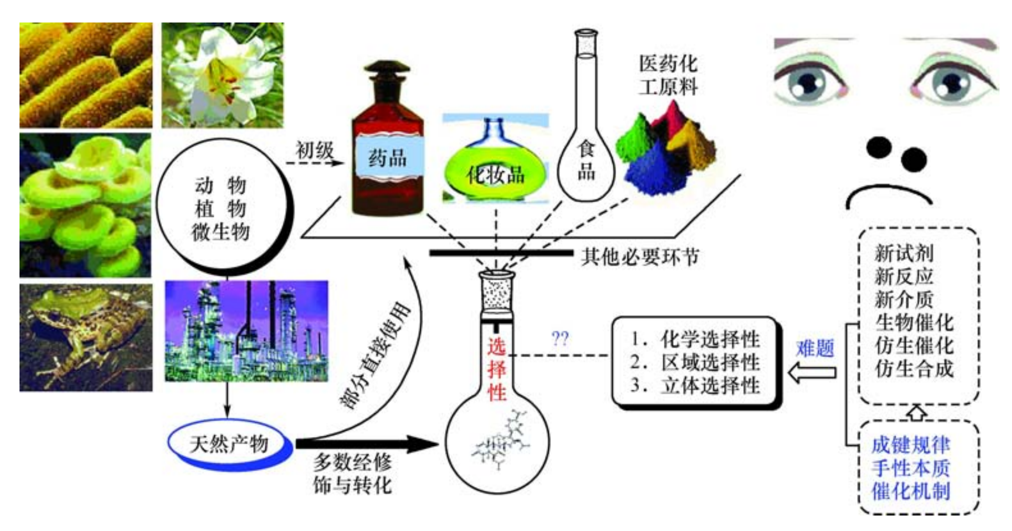


图 1　天然产物的用途及结构修饰

选择性的实现是有机化学、药物化学乃至生物学研究人员关注的重点。实现选择性的困难主要来源于：天然产物结构的复杂性；官能团的相似性；可利用的转化方法的局限性；可供选择的方法的有限性；化合物结构对立体选择性的限制。天然产物结构一般比较复杂，而结构修饰往往是对结构的某些部位进行改造，为了避免化合物的整体结构不受破坏，一些比较苛刻的反应条件或反应必须避免。天然产物中往往存在相同、相似的官能团，在只选择对某个官能团进行修饰中难以避免其他官能团不参与反应，即化学与区域选择性实现有难度；尽管有机化学家对各种官能团提供了许多转化的方法，但是由于天然产物结构的复杂性，许多方法的使用受到不拟改变官能团或者说需要保持不变的官能团的限制，因此方法选择的空间受到限制；在天然产物结构改造中，往往对局部的骨架结构进行改变，但是目前可以提供的方法种类有限，甚至没有可供使用的方法；许多活性天然产物往往具有环状结构，有多个手性中心。这些手性中心的存在是必需的。但是如果需要在这些活性化合物中引入新的手性中心，往往已有的手性中心会对新的手性中心形成产生影响，这些影响有些时候是我们可以利用的，也是所需要的，但有些时候对新的手性中心形成造成阻碍。

天然产物结构修饰的选择性研究历史与药物发展的历史几乎同步。天然产物研究 200 年来，天然产物合成与转化中的选择性就是化学家、药物学家乃至

生物学家研究的重点。针对选择性已经发展的主要手段包括化学与生物方法。就化学与区域选择性而言，针对不同官能团主要利用官能团之间的反应差异，发展了诸多选择性、特异性的化学反应；针对同种官能团之间的选择主要利用它们在天然产物结构中所处化学环境的差异来实现选择性转化，也发展了如活化、钝化、保护等策略。不经过保护的合成研究也取得了一些进展。针对立体选择性，发展了各种络合物催化、小分子催化、酶催化的立体选择性反应。针对选择性的实现酶催化的研究也异常活跃，特别是为了适应不同需求对酶的定向进化研究异常活跃。从选择性角度看，酶催化具有诸多化学方法所不具有的优点，但是酶催化存在自身的缺陷。化学方法与酶催化具有互补的作用。然而目前所有方法的共同缺点是难以达到所需要的选择性或者实现选择性的过程复杂，或者不经济，或者污染严重。

由于天然产物结构的复杂性，解决其修饰的选择性具有极大的挑战性。近期主要可能发展新的反应与试剂、新的催化体系、新的反应介质以改善天然产物修饰的选择性。长远来看，需要深入了解天然产物转化中的基础问题，包括分子识别、分子间相互作用、催化反应的机制与本质、手性的起源等。通过对天然产物生物合成中酶催化的机制探讨，实现仿生催化，同时引入新的原理与手段（如选键化学，bond selective chemistry），结合其他学科的发展等实现天然产物修饰的选择性。

天然产物选择性修饰是基于天然产物的药物发现与生产的难题。高效、高选择性的修饰方法具有重大的学术价值与现实意义。高选择性的修饰方法在药物发现阶段可以提高药物的发现效率，高效、选择性的修饰工艺在药物生产阶段可以降低药物的生产成本、降低污染。天然产物选择性修饰的新思路、新方法与新技术也是生物资源高效综合利用的前提。

参考文献

Afagh NA，Yudin AK. 2010. Chemoselectivity and the curious reactivity preferences of functional groups. Angew Chem Int Ed，49 (2)：262～310

Bertelsen S，Jorgensen KA. Organocatalysis-after the gold rush. Chem Soc Rev，38 (8)：2178～2189

Cragg GM，Grothaus PG，Newman DJ. 2009. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. Chemical Reviews，109 (7)：3012～3043

Giri R，Shi BF，Engle KM，et al. 2009. Transition metal-catalysed C-H activation reactions：diastereoselectivity and enantioselectivity. Chem Soc Rev，38 (11)：3242～3272

Li XQ，Liu A. 2010. Inspiration from protecting-group-free synthesis. Progress in Chemistry，22 (1)：81～90

Miller JR，Waldrop GL. 2010. Discovery of novel antibacterials. Expert Opin Drug Discov，5 (2)：145～154

Newman DJ, Cragg GM. 2009. Natural products scaffolds as leads to drugs. Future Medicinal Chemistry, 1: 1415
Tao JH, Xu JH. 2009. Biocatalysis in development of green pharmaceutical processes. Current Opinion in Chemical Biology, 13 (1): 43～50

撰稿人：张国林
中国科学院成都生物研究所

重要活性天然产物的发现与可持续利用

Discovery of Biologically Important Natural Products and the Sustainable Application

从天然资源中发现具有重要活性的化合物是天然产物研究的重要内容。一类重要活性天然化合物的发现，往往会向有机合成化学提出挑战，同时也将推动药理学的研究和药物作用新靶标的发现，从而意味着会发现新的药物先导结构或治疗药物。如青蒿素和紫杉醇的发现（图1），并由此引起的有机合成化学、药理学的深入研究及后续的新药研制就是最好的例证。因此，开展重要活性天然产物的发现和可持续利用研究，具有重要的科学意义和应用价值。

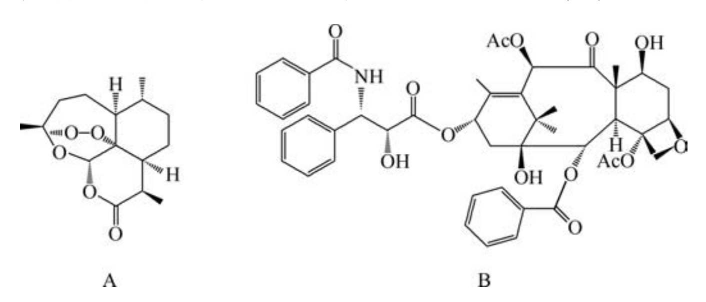


图1　青蒿素（A）和紫杉醇（B）的结构

天然产物因其具有来源丰富、结构复杂新颖及生物活性多样性的特点，已成为药物先导化合物发现的重要来源，并成为世界药学工作者公认的新药创制的有效途径之一。据统计，在1981～2006年全球上市的974种小分子新化学实体药物中，来源于天然产物的占63%，其中6%直接来源于天然产物，28%来源于天然产物衍生物，5%来源于天然产物药效团合成物，还有24%是来自因天然产物产生的灵感而合成的天然产物模拟物（图2）。在抗肿瘤药物方面更为突出，在1981～2006年全球上市的81种抗癌小分子新化学实体药物中，直接来源于天然产物或者可追溯到天然产物来源的共占77.8%。另有报告显示，仅在2005～2007年三年期间，就有79种天然产物或者天然产物类似物作为抗癌药物进入临床试验，天然产物已被证明是创制新的有效抗肿瘤药物的最可靠的单一来源。然而，如何提高活性化合物的发现速度，减少重复性、盲目性，如何获得足够量的样品以实现其可持续利用，长期以来是天然产物化学研究领域的一个经典难题。

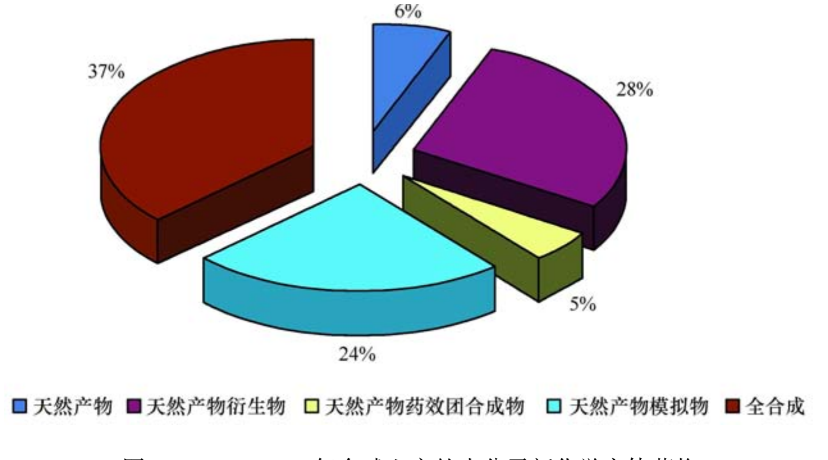


图 2　1981～2006 年全球上市的小分子新化学实体药物

天然产物提取物化学成分复杂，单体化合物的分离和结构鉴定耗时较长，即使是在活性跟踪指导下，最后分离得到的化合物要么活性已知，要么活性不强或者无活性。此外，分离过程往往会造成微量活性成分的损失。同时我们也要清醒地认识到，活性天然产物并不一定就能成为药物先导化合物，最终能用来创制新药的几率更低。1970～2006 年，共发现了数以万计的活性天然产物，其中只有 24 个被成功创制新药。重要活性天然产物的发现只是漫长的新药创制的第一步。1971 年，Wani 等首次报道了紫杉醇的化学结构和细胞毒活性。直到 1992 年，紫杉醇才作为抗癌药正式上市。创制新药是对生物活性反复求证和验证的过程，这个过程对活性天然产物是个巨大的挑战。据估测，临床前研究和临床实验的整个过程大约需要 2kg 纯化合物，相当于 20 000kg 植物干样。如果上市，市场需求每年最低 20kg，相当于 2×10^{6} kg 植物干样。因此，能否有足够量的样品已成为制约活性化合物发现和可持续发展的关键因素。

近十多年来，生物技术、分离分析技术的发展，给活性天然化合物的发现和可持续利用提供了巨大的机遇和挑战。以生物活性筛选为指导，在天然产物分离的每一个阶段都进行活性部位和活性组分的追踪，明确分离目标，能更容易地从大量的天然产物中“锁定”目标化合物，从而降低化合物分离的盲目性。高通量、高内涵、计算机虚拟等活性筛选技术的发展和应用，大大提高了活性筛选的效率，而分离纯化、分析过程的快慢则成为制约活性化合物发现速度的关键因素。因此，建立快速高效的分离纯化、分析技术和大规模的样品制备技术，对满足活性筛选的需要和加快活性化合物的发现，具有重要的意义。如高通量分离纯化技术的建立和应用，实现了活性化合物的快速分离纯化；液相色谱-质谱（LC-MS^{n}）、液相色谱-磁共振（LC-NMR）等联用技术加速了活性化合物的分析过

程；高通量制备技术的应用可以快速获得高质量和足够数量的样品，从而满足活性筛选的要求。以上几种技术的发展和应用，加快了重要活性化合物的发现进程。

天然产物中活性成分往往含量极低，如何提供持续稳定的样品量是天然产物活性成分发现和可持续利用过程中亟须解决的另一问题。利用有机合成，进行微量天然活性成分的全合成或半合成研究，是目前解决该问题最常用、最有效的手段。近年来，人们将组合化学技术应用到天然产物研究中来。通过组合化学的方法，围绕天然产物骨架构建化合物，或是合成天然产物类似物，或是创造天然产物新衍生物，既保留了天然产物结构多样性的特点，又得益于组合化学的大规模、高效率。这将为寻找重要活性的天然化合物以及实现其可持续利用开辟更广阔的空间。

我国有丰富的天然药物资源和悠久的应用中草药的历史，并且各少数民族在与疾病的斗争中积累了宝贵的民族药，这些都成为活性天然化合物发现的重要源泉。然而，由于近几十年来的过度开发和利用，药用植物资源日渐匮乏，严重影响了资源的可持续利用。药用植物组织培养技术既可实现药用活性成分的生产或药用植物的无性繁殖，又可以进行试管育苗，这一技术的发展和应用对实现天然产物资源的可持续利用具有重要意义。此外，拓展天然产物的研究对象迫在眉睫。目前世界上仅有不到1%的微生物被人们所认识，这意味着尚有数以亿万计的微生物有待人们去发现和研究。海洋不仅是地球上万物的生命之源，亦是地球上生物资源最丰富的领域。由于海洋生物与陆地生物生存环境不同，海洋生物次生代谢产物与陆地生物相比有着更大的化学多样性。近年来，微生物来源和海洋生物来源的重要活性化合物的不断发现和应用，使我们相信，微生物资源和海洋生物资源必将会成为一个巨大的新药宝库。

参考文献

Bull AT, Stach JE. 2007. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. Trends Microbiol, 15(11): 491～499

Butler MS. 2008. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. Nat Prod Rep, 25(3): 475～516

Chin YW, Balunas MJ, Chai HB, et al. 2006. Drug discovery from natural sources. AAPS J, 8(2): E239～E253

Knight V, Sanglier JJ, DiTullio D, et al. 2003. Diversifying microbial natural products for drug discovery. Appl Microbiol Biot, 62(5～6): 446～458

McChesney JD, Venkataramana SK, Henri JT. 2007. Plant natural products: back to the future or into extinction? Phytochemistry, 68(14): 2015～2022

Newman DJ, Cragg GM. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. J

Nat Prod,70(3):461～477

Ortholand JY, Ganesan A. 2004. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. Curr Opin Chem Biol,8(3):271～280

Sashidhara KV, White KN, Crews P. 2009. A selective account of effective paradigms and significant outcomes in the discovery of inspirational marine natural products. J Nat Prod, 72(3):588～603

撰稿人:侯爱君
复旦大学

重要活性天然化合物的作用机制

Mechanism of Natural Compounds with Essential Bioactivities

天然化合物是来源于生物体的代谢产物，在生命过程中发挥着重要作用；它们不但是生物体代谢过程、特性、防御、信息传递和表型等的物质基础，也是各生物体药用功能的物质基础和药物先导化合物的源泉。在200多年前，人类赖以生存的药物完全来源于天然生物或矿物，此后鸦片中吗啡的分离纯化及其作为药物的研究和应用，开启了活性天然产物和现代药物研究的时代。因此，活性天然产物研究不但源于对天然药物的研究，而且是现代药物研究的核心内容之一。特别是第二次世界大战后，由于青霉素的发现，基于活性天然化合物的药物研发取得了突飞猛进的发展，直到20世纪90年代前，临床上应用的药物约80%来源于天然化合物及其衍生物，包括抗菌（青霉素、四环素、土霉素）、抗寄生虫（avemectin）、抗疟疾（奎宁、青蒿素）、降压（利血平）、降血脂（lovastatin及其衍生物）、糖尿病（胰岛素）、免疫抑制（cyclosporine和rapamycins）和抗肿瘤（紫杉醇和doxorubicin）等药物的成功研制，不但使人们对药物的认识发生了变革，也使全世界人均寿命从20世纪初的44岁延长到目前的77岁左右。同时，活性天然化合物，特别是药物，作为生物学探针，其作用机制的研究也促进了药理学、疾病生物学及相关生命科学研究领域的快速发展，可以说每一个具有重要活性的天然化合物作用机制的研究都促成了生命科学领域和疾病治疗领域的重大发现和突破。虽然近十多年来作为天然化合物研究领域核心驱动力的制药企业的投入方向发生了改变，但是暂时的改变已经趋于回转，因为新型生物学技术和方法的应用，使得天然化合物研究的创新发现潜力巨大。

天然化合物是生物体自身制造的对其生命过程和周期有重要作用的功能有机化合物，通常情况下具有复杂多样的结构。在天然化合物的生物制造过程中，不但潜在复杂的生物学合成机制；同时，也根据每种生物体的基本或特殊需求，通过结构类型、取代基团及其立体构型等化学结构特征，编码了重要的生物学调控过程和功能等信息。因此，每种生物体制造的天然化合物结构的复杂多样性，一方面反映了来源生物体制造过程及其机制的复杂多样性，另一方面反映了它们在来源生物体内部的作用或功能及其机制的复杂多样性；同时，也反映了它们与其他生物体作用的过程中，产生活性及其机制的复杂多样性。尽管，这些复杂多样的生物学过程和机制，一直是吸引科学家们不断深入探索的自然科学领域的前沿

科学问题，然而相对于数百万计的复杂生物学物种体系及其包含的成百上千的复杂多样的天然化合物，到目前为止被人们了解和认识的活性和机制问题仅是“冰山一角”。

迄今为止，从生物资源（包括海洋生物、真菌、放线菌等）分离鉴定的不同结构的天然化合物近 20 万种，而且随着研究过程中新型生物学检测方法和技术的应用，不论是新的还是已知的天然化合物的生物活性被逐步发现，特别是在与肿瘤、艾滋病、糖尿病等重大疑难疾病相关生物学模型上显示出十分显著的活性，但是这些活性只是初步筛选的结果，对其活性机制的系统深入研究是涉及多学科的难题。重要活性天然化合物研究的难点主要体现在三个方面。首先，多数情况下重要活性天然化合物在来源植物中的含量低，从源植物中获取用于机制研究的足够样品非常困难；其次，活性天然化合物的结构复杂，存在与活性密切相关的环系、功能团和手性，化学合成难度大，复杂结构活性天然化合物的合成本身就是有机合成化学和药物化学共同面临的重要难题和挑战；最后，活性天然化合物作用机制的复杂性。活性化合物的作用机制研究不是简单地寻找或发现化合物与一种生物功能分子的相互作用，而是需要寻找并确证活性产生的生物学过程及其网络关系，包括其对作用靶点（受体、酶、离子通道、核酸和基因等生物功能大分子）产生和形成过程的调控，对靶点功能的影响，以及与靶点分子相互作用的位点及其与活性的联系等一系列生物学问题的阐明（图 1）。

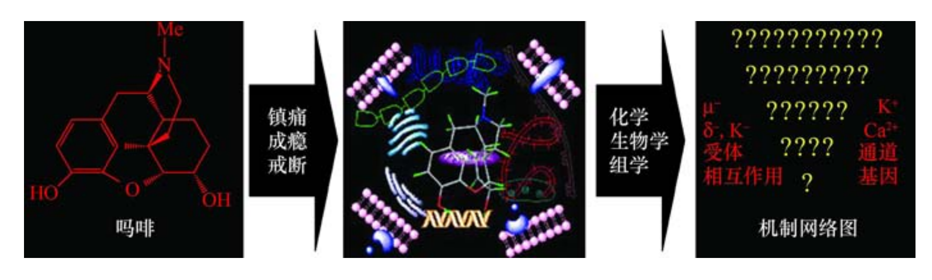


图 1　“牵一发，动全身”的网络机制是生命体的基本特征。数十年的研究表明，尽管吗啡镇痛、成瘾及其戒断症状等药理活性的表型特征与多种具有免疫系统不同分布特征和不同底物亲和作用的吗啡受体（至少与 μ，δ 和 κ G 蛋白偶联受体）相关，每种受体通过包括腺苷酸环化酶、K^{+} 和 Ca^{2+} 通道及促细胞分裂剂活化的蛋白激酶等通路，介导着独特的生理学功能和药理作用。然而，到目前为止尚难勾画出清晰明确的吗啡作用机制网络图。吗啡作用机制是各种组学技术和方法应用研究的热点内容之一

重要活性天然产物机制研究不但需要在分子水平阐明活性产生的过程及相关分子间相互作用和联系的网络系统，也需要在细胞和整体动物上阐明相关机制的表型反应和特征。由于生命过程的整体和平衡特性，越来越多的事实显示在生命活动的基本单元内一种生物活性的产生不是简单和孤立的现象，而是新的平衡体

系建立中连锁反应的表象，包含了有利和不利的双重性；同时，一种生物功能分子（或靶点）虽然可以通过分离独立出来并保持其基本功能，但是它们在生物体系中不是孤立存在而是存在网络联系，一种生物活性的产生必然包含了这一网络系统中生物功能分子之间的信号转导和新的平衡调控反应。因此，在重要活性天然产物机制的研究过程中，需要灵活和系统地运用后基因组时代新兴的各种组学的思路和方法及其技术和手段，从生物体系中寻找和发现活性天然产物的分子靶点及其网络联系；以及基于计算机技术的化学和生物信息学方法和手段，从化学和生物信息中寻找和发现活性天然产物作用机制的线索；同时需要建立和选择使用更加合理的表型研究模型。

参考文献

Kamb A. 2005. What's wrong with our cancer models? Nat Rev Drug Disc, 4: 161～165

Keiser MJ, Setola V, Irwin JJ, et al. 2009. Predicting new molecular targets for known drugs. Nature, 462 (12): 175～181

Li W-HJ, Vederas JC. 2009. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? Science, 325: 161～165

Lindsay MA. 2003. Target discovery. Nature Rev Drug Discov, 2: 831～837

Newman DJ, Cragg GM. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. J Nat Prod, 70: 461～467

Newman DJ. 2008. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery? J Med Chem, 51: 2589～2599

Renner S, van Otterlo WA, Soane MD, et al. 2009. Bioactivity-guided mapping and navigation of chemical space. Nat Chem Biol, 5(8): 585～592

Superti-furga URG. 2009. Target profiling of small molecules by chemical proteomics. Nat Chem Biol, 5(9): 616～624

撰稿人：石建功　林　生

中国医学科学院药物研究所

中医学篇

脏腑的表里机制

The Mechanism of the Viscera's Interior-Exteriorly Related Theory

1. 背景

中医学认为人体是一个统一的有机整体。人体各脏腑器官通过经络相互沟通，相互联系，并依据脏腑所在部位和功能特性的不同，构成了不同的联系关系。如有脏与脏、脏与腑、脏与体表器官组织等多种相关关系。其中脏与腑的关系，即是脏腑阴阳表里相合的关系。依据中医学理论五脏的主要功能是储藏人体的精气，这是说人体的各种精微物质，包括精、气、血、津液等，均储藏于五脏，所以五脏属阴而为里；六腑的主要功能是受纳、消化饮食物并传导、排泄糟粕，也称为传化水谷，所以六腑属阳而为表。由此脏与腑的联系关系，也称为脏腑互为表里关系。

脏腑的表里关系表现在生理活动中，脏与腑之间互相促进，如肺气肃降，有利于大肠的传导，而大肠的传导也有助于肺气的肃降。在病理上，脏与腑之间常互相影响传变，如心经有热，可以循经下移于小肠，小肠火亦可循经上扰于心等。在治疗上对五脏注重补益，六腑则注重消导；还经常运用"脏实者泻其腑"、"腑虚者补其脏"的法则，即后世所谓的"脏病治腑，腑病治脏"说。这一理论在中医临床诊疗中已沿用千年，至今仍在发挥着自己的应用价值。

中医学对脏腑器官功能的独特认识，有别于现代熟知的立足以解剖为基础的西方医学体系。然而在临床治疗中，针对一些难治性疾病，在采用以解剖生理、药理作用为基础的各种治疗手段疗效不理想的时候，应用中医脏腑表里相关整体调理又每每获效。这给医学界带来困惑的同时，也给医学爱好者带来研究的兴趣。因此，对脏腑互为表里机制内涵的揭示受到了国内外医药学界研究者的关注和重视。

2. 科学意义

脏腑的表里相关关系主要由"肺合大肠（即肺与大肠相表里，余脏仿此）"，"心合小肠"，"脾合胃"，"肝合胆"，"肾合膀胱"五个方面组成。这就是说肺、心、脾、肝、肾五脏与大肠、小肠、胃、胆、膀胱之间存在着相对应的互为促进、互为影响的关系。中医学对脏腑间关系的这种认识，是结合临床疾病发展变化规律，从整体动态的角度分析归类得出的结果。说明生理状态下各脏腑器官除自身的功能效用外，还存在着相互间的协调与制约规律，这种规律是本质于脏腑

又高于脏腑的整体调控机制；由此在治疗上它强调以恢复脏腑之间的阴阳平衡和气血调和为宗旨，是中医学整体观念和辨证论治的特色赖以发挥的重要基础理论之一。目前医学研究者在很多难治性疾病的治疗中已经开始从重视病因学转向对病理过程的关注，逐步发现这类疾病存在多因素特征和多环节复杂的病理过程；而纯粹以西医学组织生理、药物作用为依据建立的多环节联合用药，又会导致多系统的不协调而引发新的病理损害，而通过中医学脏腑相关理论进行辨证却能获得成功。然而脏腑表里关系理论至今还未能从实证科学的角度获得升华，内涵与外延尚未获得充分阐明，从而限制了这一科学理论的进一步发展与临床应用。完全不同于西医学的中医学脏腑表里机制，不仅在临床治疗疾病中有着不可替代的优势，而且在对中医藏象本质内涵的研究中也有举足轻重的作用。因此，也是中医学发展的关键科学问题之一。

3. 最新进展

脏腑的表里机制以它独特的临床治疗理念和明显的疗效，一直受到国内学者的关注，目前已广泛开展了肺与大肠、心与小肠、脾与胃、肝与胆、肾与膀胱常见病的临床疗效观察，通过辨证，采用脏病治腑、腑病治脏或脏腑同治的治疗理论，取得满意的疗效，初步证实了该理论在临床上具有重要的实用价值。以“肺与大肠相表里”理论为例，国内相继开展的研究发现：肺病可及肠、肠病可及肺，肺肠互治的疗效也得到了普遍的认可。但由于其效应机制不清，缺乏生物学本质的揭示和效应机制的总结，因而使得相关中医、中西医结合理论目前还没有得到进一步的创新与升华。

同样的研究在国外医学界也在悄然进行着，从20世纪90年代初开始，他们对“肺与大肠相关”的命题，从胚胎发育、生理生化、内毒素/菌群失调等方面进行了大量的实验研究，发现两者从生理结构到功能都存在着一定的相关性。证实肺、气管与肠具有相同的结构基础，肺、肠黏膜可产生具有相同效应的活性物质，肺与大肠共同受神经-内分泌-免疫网络的联系和调控等。但活性物质是否具有特异性，调控机制如何在肺与大肠之间发挥作用等，这些问题目前还都没有获得比较满意的解答。此外，肺与大肠的这种相关现象无法通过现代解剖学中肺、大肠等孤立器官进行解释。但是正是这些研究工作，说明中医理论中脏腑的相关机制蕴含着深奥的生命科学理论，对它的研究不仅是中医学发展的需要、临床难治性疾病诊治的需要，而且对推动生命科学的研究也是不可或缺的，它也将拓宽生命科学研究的领域。

4. 主要难点

可见，中医脏腑的表里相关理论不仅具有重要的理论意义，也有着重要的临床价值，但脏腑表里关系的物质基础是什么？是通过什么途径实现的？其确切机制至今尚未明了。中医脏腑表里关系理论是根据脏腑的功能及相互作用而建立的

互动关系理论。实践表明，这种表里关系，不仅在结构上不可分割，生理上相互关联，而且在病理、治疗等方面也都相互影响。但是，这种表里关系仍停留在现象理论的认识上，始终没有形成系统完整的理论体系。如何结合现代医学手段对其进行科学实质的探讨，突破既往单纯逻辑性阐述的理论推断，形成具体、可检知的关于“脏腑相表里”的生理、病理机制的实质，是其难点所在。

5. 展望

解决这一难题的可行思路是：从古今中外文献研究和中医临床疗效基础雄厚的难治性疾病的临床研究入手，结合现代实验检测手段，阐明脏腑传变和病机转化的特征，综合分析脏病治腑和腑病治脏的疗效优势，以及疗效产生的规律与机制；从发育组织学、生理学、生物化学、免疫学、病理学、药代动力学以及分子生物学等多角度，分析生理和病理状态下脏与腑相互影响的内在联系及协调机制。结合疗效分析，建立基于中医脏腑相关理论的难治性疾病治疗的新思路，创新和丰富中医脏腑理论的科学内涵，提升其临床应用价值。

诚然，中医的脏腑不能等同于西医的脏腑器官，但是两者研究的对象是一致的。因此，研究工作可以在了解实体脏器的基础上，重点从中医学所认识的脏腑功能及其生理病理的相关性角度展开，以符合中医特点的研究思路与方法为指导，借用现代科学技术方法，通过文献研究、临床研究、实验研究等手段，界定脏腑表里关系理论的内涵和外延，真正揭示脏腑生理上相互影响的生物学基础和病理上相互传变的发生规律，以及脏腑互治的内在协调的效应机制，以促进这一科学难题的破解。

脏腑表里关系理论本质的阐明，将突破以系统解剖学实体脏器为基础的有关生理、病理学及临床治疗方面的习惯思维，发现新的关于人体功能调节和相互协调的途径，并在难治性复杂疾病研究思路上凸显中医药的特色和优势。这不仅可以创新和深化中医藏象理论，解决临床难治性疾病的防治问题，并将促进中西两大医学系统的交叉渗透和融会贯通，为创新和升华中医学理论，为不断丰富和发展中医学理论体系做出贡献。

参 考 文 献

刘福成，薛芳，崔志永．1992．大承气汤治疗严重创伤呼吸窘迫综合征的实验与临床研究．中国中西医结合杂志，12(9)：5411～5413

苏惠萍．1995．通腑法治疗哮喘发作期的临床应用．北京中医药大学学报，18(5)：641～642

田在善，李东华，沈长虹．1998．大承气汤对肠源性内毒素血症模型大鼠肝、肺、肾损害保护作用的病理学观察．天津中医，15(1)：341～343

王今达．1982．中医学“肺与大肠相表里”学说的临床意义及其本质的探讨．中西医结合杂志，2(2)：771～774

郑舜华，崔儒涛．1999．补肺方抗实验性溃疡性结肠炎大鼠脂质过氧化损伤的研究．中国中医药

科技,6(4):231～232

Aman S,Coonar MD, David M Hwang,et al.2007. Pulmonary involvement in inflammatory bowel disease. Ann Thorac Surg,84:1748～1750

Ekici A,Guliter S,Ekici M,et al.2005.Irritable syndrome in young and elderly patients with stable asthma. Dig Liver,37(10):773～778

Mahadeva R,Walsh G,Flower CD,et al.2000. Clinical and radiological characteristics of lung disease in inflammatory bowel disease. Eur Respir J,15:41～48

撰稿人：高思华　李宇航　林　燕

北京中医药大学

“心主神明”和“脑为元神之府”

“Heart Storing Spirit” and “Brain Is the House of Mind”

1. 背景

“心主神明”和“脑为元神之府”是中医学对神志活动产生的两种观点。关于神志活动的产生，中医学和西医学有着截然不同的看法。中医学把精神活动归属于五脏，并认为与心的关系最为密切，称之为“心主神明”。西医学认为，人的精神、意识及思维活动，是大脑的生理功能，是大脑对外界客观事物刺激做出的反应。《本草纲目》辛夷条，李时珍提出脑与精神活动有关，谓“脑为元神之府”。随着中医理论的不断发展和近代西医学的渗透，对“心主神明”和“脑为元神之府”的探讨，受到了学者的关注。2003 年《中国中医药报》依据陈士奎发表的《对中医学“心主神明”和“脑主神明”的再认识》与邓铁涛发表的《“心主神明”论的科学性》两篇文章，发起了“谁主神明”的大讨论。该命题讨论的焦点集中在三个方面，即“心主神明”、“脑主神明”和“心、脑共主神明”，从而引发了脑、心之间与神志关系的辩论。

2. 科学意义

“心主神明”是中医藏象学说中一个十分重要的命题，一直指导着中医临床实践。但是随着西医解剖学的传入，脑成为思维器官已为大多数人所接受，“心主神明”似乎应该改为“脑主神明”。应当指出，在《黄帝内经》形成时期，对脑即有争论。如《灵枢 · 海论》就有“脑为髓海”、“髓海不足，则脑转耳鸣，胫痠眩冒，目无所见”的记载，可以说古人也意识到脑与神志活动有某种重要联系，并没有完全否定脑与精神活动的关系；而《黄帝内经》最终将脑定位为奇恒之腑，把神志活动归属于五脏，由心所主，这是由中医藏象学说五脏与神志活动相连属的理论所决定的。藏象学说认为头部的口、眼、鼻、舌、耳等接受外界信息的重要器官，与五脏相通应，外界信息可传入五脏，并由心来做出反应和判断。因此，邓铁涛认为，要理解“心主神明”，首先要理解中医的藏象学说。所谓“藏象”，就是心、肝、脾、肺、肾五个脏的宏观外象，即人体的五大系统，心脏是五大系统的核心。这一理论来源于实践，又指导实践，如临床上见到人易惊恐，精神不能集中从心气不足论治；失眠多梦，神疲乏力从心血不足论治；烦躁不安，急躁易怒，甚则神昏谵语，不省人事则从血热扰心论治；狂、癫、痫的患者多为痰迷心窍，瘀血阻心，常用化痰开窍之法而收效，由此心主管神明（思

维、决断)，也是理之使然。可见明确脑、心之间与神志的关系不仅关系到中医理论体系的发展、中医研究的发展方向，也关系到如何处理与西医学的关系等重大医学理论问题。

3. 最新进展

自《本草纲目》提出“脑为元神之府”说之后，心主神明说一直受到挑战。如清代医家王清任所著的《医林改错》说，“灵机记性不在心在脑”，直接提出脑是精神神志活动的场所。有学者认为从战国到秦汉，中国传统文化始终认为脑与神明相关，中医学在建构其理论体系时未能纳入这一认识，影响了后世医学思想的发展。临床上也有学者从观察人体植物状态而力倡“脑主神明”。另有研究者认为，王氏独立创新、大胆疑古的精神难能可贵。但是综观全书，他从解剖生理学观点来解释这一点，又与中医藏象学说有所相悖。中医藏象学说中的脏腑，不单纯是指解剖学中某个实质性的脏器，其中一个脏腑的功能往往概括了西医解剖学中几个脏腑的部分功能，它不唯在生理病理上构成独特的、完整的理论体系，而且也构成相应的理法方药的独特诊疗体系。对这个理论体系，不能用单纯的解剖生理学观点来判断中医脏腑功能的是与非，更不能完全据此进行中医理论和实验研究。

近代医家张锡纯首倡“心脑共主神明”的观点，试图将“心主神明”和“脑为元神之府”主神明的观点统一起来。同意此说的学者，指出“思”的上半部为囟，下半部是心，暗示了思想既和心有关，又和脑有关的观点。也有的认为“心主神明说”源出经典《黄帝内经》，具有很高的权威，“脑主神明说”很可能受西医学的影响而源于明清，显示了蓬勃的生机。但两种学说各有缺憾。根据中医藏象理论和临床实践，提倡心脑并主神明说，这是认识上一个较高的层次。也有的认为“心主神明”和“脑主神明”是一个问题的两个方面。“心主神明”是从脏腑功能的控制调节立论，而“脑主神明”是从物质场所立论。“心脑共主神明”，心调神、脑生神、心的神明的产生和变化中的作用比脑更为重要。目前在医学界心理治疗异军突起，以及既存在于脑、又分布在肠道的神经肽类物质的发现，将成为解释中医藏象学说有关“心主神明”理论观点的佐证。

4. 主要难点

“心主神明”和“脑为元神之府”的争议焦点是谁主神明，这也是中医、西医两种医学在研究人体时方法论的分歧。西医起源和发展于科学技术的分析时代，注重从解剖学出发研究人体生命的规律；中医侧重于临床的诊疗实践与对动态现象的归类分析，来研究脏腑功能，因此常常受到古代哲学思想的影响。如先秦以前古代哲学家就认为人的精神活动是心的功能反应。如《论语 · 为政》曰：“七十而从心所欲，不逾矩”；《荀子 · 解蔽》言：“心者，形之君也而神明之主”；等。这些论述是将“心”作为思维意识的器官来认识的。

由此可见，“心”与“脑”之争，如以实体解剖学定位来研究中医的脏腑功能体系，就走进了误区。而受到古代哲学思想影响所建立的中医脏腑功能体系，是一个复杂的多因素体系。心、脑与神明之间的关系可谓是实体模型与唯象模型之间的认识关系。中医学是唯象模型，研究的是人体功能体系，而现代医学研究的是西医实体解剖学。要想正确地解释两者的关系，其重点与难点在于对“神”的诠释与研究。

5. 展望

“心主神明”基于中医藏象学说，它不单纯指解剖中某实体器官，更多是侧重于生理病理的综合功能单位。“脑为元神之府”与现代解剖、生理学有相近之处，中医学也有很多的相关记载，但它与中医学藏象思维模式及整体观理论体系有所不同，两者从不同的角度阐释了人体生命与精神神志的关系。如果能够在梳理相关中医学概念的基础上，结合现代的研究成果，系统全面地诠释“神”的含义，有望为本难题的解决提供新的思路和方法。

参考文献

郭增元.2009.从植物状态论“脑主神明”.中国民族医学杂志,(12):70～71
王小如.2007.脑主神明理论的源流及内涵.山东中医杂志,26(6):366～368
王颖晓.2005.中医神明之争析疑.辽宁中医药大学学报,7(2):110
尤永超.2007.如何看待中医的“心主神明”理论.贵阳中医学院学报,29(3):8～9
张俊龙.2001.“脏腑之主”研究.山西中医学院学报,2(1):51～53
张俊龙.2001.从“脑主元神”论建立中医藏象学说新体系的构想.山西中医学院学报,16(4):67～68
张俊龙.2001.中医脑理论演进轨迹.山西中医学院学报,2(3):43～47
张俊龙.2002.脑与五脏关系论.山西中医学院学报,3(2):7～10
张其成.2004.中医哲学基础.北京:中国中医药出版社,290

撰稿人：张俊龙　张维骏
山西中医学院

脾主运化是如何实现的

How Does the Spleen Transport and Transform the Food and Drink

1. 背景

脾主运化，是指脾具有消化吸收饮食物中的水谷精微并将其转输至全身的生理功能。脾主运化，包括运化食物和运化水液两个方面。运化食物是指脾气促进食物的消化和吸收，形成水谷精微（营养物质）转输到全身各脏腑的作用；运化水液是指脾气的吸收、转输体内津液（体内正常水液），配合肺、肾、三焦、膀胱等脏腑，维持水液代谢平衡的功能。此外，脾位于中焦，它对全身气机（气的运动）具有枢纽调节作用，脾气的转输与输布促进了全身精、气、血、津液的化生和生理作用的发挥，实现其运化功能，体现了它与多个脏腑之间的密切关系。因此，中医学认为脾是“气血生化之源”，从而确立了脾为“后天之本”的特殊地位。脾主运化成为饮食物代谢过程的中心环节，维持人体生命活动的主要生理功能之一。由此可见，中医学所说的脾主运化功能与现代医学中脾器官功能的概念差别很大，从而受到了医学界的关注与重视。究竟中医脾主运化功能是如何实现的，虽经学者们的大量研究，至今尚未真正解释清楚。

2. 科学意义

对脾主运化功能分析可见，中医学所述的“脾”是与实体脏器组织相关的综合功能单位，它包括了脾、胃、大小肠等一系列的功能特点，是一个宏观的认识，不是简单的解剖意义上的脏器功能的集合，更不同于现代医学单纯的脾器官。现代研究认为中医的脾，是以消化系统为基础的，包括能量代谢和水液代谢，并与血液、内分泌、免疫和神经系统等有密切联系的一个多系统、多器官的功能单位。因此，脾主运化功能的实现也就要通过多系统共同完成，有统计表明，在一般杂病的发展过程中出现脾虚见证者达87.9%。因此，运用现代科学技术和方法阐明脾主运化功能的形成机制，不仅可以提高消化系统疾病的疗效，而且可以治疗其他系统表现出脾虚证候的疾病，如白血病、功能性子宫出血、重症肌无力、痴呆，以及很多的疑难杂症等。也为揭示中医证候本质、中医临床疗效评价、中药新药开发等一系列研究工作打下坚实的基础，具有十分重要的现实意义和深远的科学意义。

3. 最新进展

脾主运化，若脾气虚损，脾失健运，则可见食欲不振、腹胀、便溏，以及倦

怠、消瘦等症状。这些症状是中医脾虚证的基本要素。因此，自20世纪80年代以来，以消化系统疾病为主的脾虚证的研究，对脾主运化机制的探讨十分有意义。在寻找脾虚证“金”指标的研究中，发现唾液淀粉酶活性比值、*D*-木糖排泄率和胃电图三者合参，对脾气虚证诊断的阳性率为95.1%，认为可以较全面反映脾气虚证的本质；20世纪90年代对脾虚动物模型的研究也从单因素到多因素，从单纯病理模型到病证结合模型逐步完善。并发现脾虚证与其他系统如能量代谢、心功能、血液学、免疫学、神经科学等也有相关性，显示了脾虚证候在机体多个方面都有特定的改变；21世纪初随着分子生物学的发展，抗氧化及自由基、细胞凋亡、基因、蛋白质、信号转导及神经肽等多个方面与脾虚证的关系进行了探讨，大量的实验和临床研究发现至少有70多种指标因素与脾虚证相关，但是有特异性且阳性率高的不多，可见中医的脾虚证是多因素的，这符合脾主运化功能的转输与调节，涉及五脏的独特性。由此提示，从脾虚证的角度，选择有代表意义的指标群，多指标合参是分析研究认识脾主运化机制的最佳选择，也是一个十分有意义的途径。

4. 主要难点

中医的脾是以消化系统为主的多系统的功能综合单位，脾虚证涵盖多脏器、多系统功能异常，伴诸多微观指标的改变；又传统中医是宏观辨证，目前大家公认脏腑功能是一种综合性的功能态，因此任何单一的特异性指标、微观改变或实验室检查目前尚不足以说明脾的实质。对脾主运化是如何实现的研究主要难点在于中医对脏腑功能的认识是建立在实体脏器基础上的一组功能系统，所以很难用某一特异性的指标对脾主运化的生物学基础进行完整的定位或表征，且尚未找到研究的突破口；反映脾虚证的标准化、规范化未达到从基础到临床的真正统一，因此使基础研究、动物模型的研制、临床疗效的评价、新药研发的依据等都存在着不一致性，很难得出公认的、确实的、重复性高的研究成果，这也成为中医藏象学说研究的难点，更是中医药研究的瓶颈。

5. 展望

对脾主运化是如何实现的研究要从整体来把握：①传统文献的研究，从脾虚证切入对历代医家的认识论述加以归纳、分析、整理，明确脾虚证的内涵与外延，明确其在与其他脏腑的相关关系中的地位和作用；②从临床流行病学的角度，采取大样本、多中心，借助数学建模和分析统计软件，结合现代中医临床的标准化、规范化和临床的前瞻性研究，探讨脾主运化的生理基础；③从基因、蛋白质表达角度，利用基因工程技术等复制中医证候转基因动物模型，增加模型的稳定性、可重复性；④借鉴现代医学、生物学领域中相关整体调控的理论，如神经内分泌免疫网络、系统生物学等，寻找网络的核心指标，并进行复杂关系的分析；⑤对微观指标通过现代数理统计方法和信息处理技术，从中医整体调控的视

角对参与整体调节的信息物质的作用关系进行研究，如通过人工神经网络、决策树、数理统计技术和信息技术构建证候微观指标相互关系的模型和分析，从中提出合理的假说，提供研究思路与方法，然后从临床和基础两方面进行论证研究，并不断修正假说，最后得出完整的认识。因此，生命科学的高新技术的导入，以及数学、物理、哲学等多学科的共同参与，才可能是解决这个难题最快捷和最有发展前景的研究途径。

参考文献

蔡琴，程东庆．2009．中医脾虚证本质的中西医结合研究进展．亚太传统医药，5(10)：133～135
侯丽颖，刘友章，贺松其，等．2008．中医脾与线粒体功能的相关性探讨．上海中医药杂志，42(7)：3～4
黄河，林亚平，易受乡，等．2010．脾虚证相关检测指标的研究进展与思考．医学信息，23(4)：1504～1507
江玉，王明杰．2006．脾虚证的研究进展．泸州医学院学报，29(3)：269～270
李保良，罗仁，刘友章，等．2005．水通道蛋白与脾主运化关系探讨．中西医结合消化杂志，13(5)：321～323
王朋，刘桂荣．2008．脾运化功能是脂质代谢的关键．江西中医学院学报，20(3)：23～24
王晓明，易杰，廖世新，等．2006．脾虚证动物模型的客观评估．中华中医药杂志，21(7)：406～408
魏睦新，胡平．2009．消化病中西医结合基础研究评述．世界华人消化杂志，17(25)：2545～2549
徐春梅．2006．浅议微循环是中医脾主运化的形体生理解剖基础．陕西中医，26(9)：1105～1107
朱泉．2005．中医证候机理研究思路的反思．现代医药卫生，21(2)：2816～2817

撰稿人：孟静岩
天津中医药大学

如何理解“心藏神”

How to Understand“Heart Storing Shen”

1. 背景

中医学现存最早的经典著作《素问·宣明五气篇》明确指出“心藏神”。心藏神，是指心有主宰生命活动和精神活动的功能。

中医学“心藏神”的概念受到中国传统文化的深刻影响，有两个层次上的内涵。《易传·系辞上》说：“阴阳不测之谓神。”神是阴阳二气运动所产生世界万物奥妙无穷变化的内在动力，为天地万物的主宰。又《孟子·告子上》说：“心之官则思。”官，即功能。凡与意识、思维活动有关的汉字，几乎都以“心”或“忄”作为部首。

中医学认为，心藏神，具有主宰人体生命活动、协调五脏六腑的生理功能。《素问·六节藏象论》说：“心者，君主之官，神明出焉。”《灵枢·邪客》说：“心者，五脏六腑之大主也，精神之所舍也，其脏坚固，邪弗能容也。容之则心伤，心伤则神去，神去则死也。”人有五脏六腑、四肢百骸、形体官窍，各具不同的功能活动，必须在心神的主宰和调节下，分工合作，共同完成整体生命活动。心神正常，则人体各器官的功能互相协调，彼此合作，全身安泰。病理状态下，邪气侵犯，“心伤神去”，则为死亡之征。如《素问·移精变气论》说：“得神则昌，失神则亡。”

人类生命活动的高级形式是精神活动。精神活动，包括意识、思维活动和一般心理状态。《灵枢·本神》说：“所以任物者谓之心。”心具有担任接受外界客观事物的刺激，通过心理、意识和思维活动，做出反应和处理的功能。精神活动包括神、魂、魄、意、志、思、虑、智的复杂过程，而心神主导着复杂的精神活动，并由五脏协作共同完成。

中医学“心藏神”理论应用于解释病因、诊断疾病、临床治疗、养生保健等方面。例如，喜、怒、忧、思、悲、恐、惊七情内伤，首先影响心神。中医学诊断疾病重在“望神”，即通过观察患者神气的得失有无，以分析病情及判断预后的诊断方法。中医学特色的“脉诊”，“脉贵有神”，即脉象柔和有力，形体指下分明。与“心藏神”相关病证有心悸、胸痹心痛、不寐、健忘、痴呆、中风、厥证、癫狂、郁病等，从“心藏神”辨证论治具有良效。中医养生，以调神为首要，故《素问·四气调神大论》以此为篇题，详细论述了顺应自然、调养神气的养生之道。

2. 科学意义

“心藏神”是中医理论体系的重要组成部分，其功能活动对维持生命活动及其意识、思维等精神活动具有重要作用，对临床发挥辨证论治的优势和特色具有指导意义和应用价值。因此，深入研究“心藏神”功能的生物学基础，有利于提高中医理论的学术水平，有利于揭示生命活动的奥秘，有利于解析思维科学的内涵，有利于指导临床预防、养生、诊断、治疗和康复，为创新中医理论体系做出贡献。

3. 最新进展

“心藏神”的实质是尚待解决的科学难题之一，专题研究的文献资料较少。国医大师邓铁涛曾撰文阐述心主神明论的科学性，文中提到，1983年3月第一个植入人工心脏的克拉克死亡，尽管人工心脏还在不断泵血，但血管变得松弛无力，发生膨胀，则循环系统功能丧失，接着结肠、肾、脑功能丧失。依此推论，心脏被置换之后，“心激素”分泌停止，当肺脏代替心的部分功能维持超过了一定的限度，“心激素”在体内的储存用尽之时，生命便停止了。也有资料认为，心脏磁场比脑磁强百倍，心磁可以干扰、调控脑磁代谢……心磁是人体控制性结构，是地球及太阳磁场自然选择的适应性结果。有专家提出，中医心神说是由于中医朴素的系统观和独特的司内揣外的研究方法决定的，侧重于反映神经-内分泌-免疫网络免疫部分信息处理的整合特点。也有文献主张，心脏不仅是血液循环器官，还是一个重要的内分泌器官，心脏和血管受全身神经、激素、细胞因子的支配和调节，同时会产生和分泌多种激素和血管活性物质，如心钠素、血管紧张素、儿茶酚胺、前列腺素、内皮素等，这些血管活性物质，既可作为循环激素，直接作用于心脏血管，影响局部和全身循环，同时又可通过血循环运送到各系统、器官，发挥生物活性，这显然会对大脑活动、精神心理产生作用。有学者提出，心主神明，是对精神-神经-内分泌-靶器官这个机体最重要的调控网络的整体概括，是中医学整体观念、五脏相关的重要体现。诺贝尔奖获得者美国神经学家约翰·C. 埃克莱斯用了大量精力研究精神活动的机制，提出意识活动与脑物质结构（包括神经物质结构的分泌）二元论的思想，其间关系似乎像量子力学中的选择性事件，具有或然性，从而为神志与精气间的复杂关系提供了部分证据。

4. 主要难点

“心藏神”研究的难点在于：①“心藏神”功能的生物学基础是什么？②“心藏神”功能如何主宰生命活动和协调五脏六腑的生理功能？③“心藏神”功能如何主宰意识、思维等精神活动？目前，对“心藏神”功能的科学研究尚在探索之中。

5. 展望

“心藏神”理论基于中医学原创思维和临床实践。从临床工作中发现和提出

问题，深入研究“得神”、“失神”、“望神”、“脉诊之神”、“调神”等生理功能、病理变化和诊治方法，从中探讨“心藏神”功能对生命活动和意识思维的主宰作用，并有效利用现代科学技术，与基础研究相结合，进而回归临床，对提升“心藏神”理论的学术水平，将会开辟新的途径。

中医学认为，思维是“心藏神”所特有的功能活动，是人的意识掌握客观事物的高级形式。现代思维科学是一门把哲学与自然科学结合起来，把宏观研究和微观研究统一起来，从总体上研究思维活动规律和方式的学科。从思维科学入手，依据中医学“心藏神”功能的基本概念和基本规律，深入进行“心藏神”功能的生物学基础研究，可能对“心藏神”功能的理论和实践有所创新。

参考文献

邓铁涛.2003.心主神明论的科学性.新中医,35(3):15～16
李永光.1981.心神说初探.中医药学报,(4):21
林文娟.1997.心理神经免疫学的研究及其思路问题.心理学报,29(3):301～302
王庆其,李兆健.2002.心主神明和脑主神明的研究.中国中医药年鉴,174～175
烟建华.2006.《内经》神概念研究.河南中医,26(1):4～7
杨戈,林水淼.2003.试论心主神明.辽宁中医学院学报,5(3):205～206

撰稿人：郑洪新
辽宁中医药大学

肺脏如何调节水道

The Biology Basis of the Theory That the Lung Has the Function of Dredging Water Passages

1. 背景

西医学告诉我们：肺的主要功能是呼吸，参与体内外气体的交换；然而，中医学认为：肺除主呼吸之外，还“主通调水道”，参与调节水液代谢，肺是体内参加水液代谢的重要器官之一。它在生理上，一是通过宣发，将水液布散于皮毛和周身，发挥其滋养作用。到达皮毛的部分水液，在卫气功能调节下，部分生成汗液，排泄于人体外部。此外，肺在呼气中也可带走部分水液。二是通过肃降，将上焦水液向下布散，其中部分水液经肾的气化作用下输到肾和膀胱，生成尿液排泄至人体外部。同时向下润泽大肠，推动大肠的传导，又通过大肠对粪便的排泄带走部分代谢废液。所以《素问 · 经脉别论》说：“饮入于胃，游溢精气，上输于脾，脾气散精，上归于肺，通调水道，下输膀胱。”由于肺位于人体的上部，主行水而通调水道，其宣发肃降作用可疏通和调节水液代谢，故又被称为“水之上源”，对人体的水液代谢起着重要的调节作用。

如肺的宣发或肃降功能失常，水道失于通调，水液代谢障碍，即可见尿少、颜面和周身水肿、痰饮、咳喘等症。而见到浮肿、小便不利之证时，运用宣肺行水之药，以通利小便，消除水肿，往往收效，这种方法也被称为“提壶揭盖法”广泛地应用于临床。

2. 科学意义

大量临床实践提示，中医学所说的肺，并不能仅仅局限于西医形态学所说的肺来解释，它除了“主气，司呼吸”之外，还具有“通调水道”的功能，而肺的这种调节全身水液的功能，是肺参与全身水液代谢整体调节功能的表现。因此，运用现代的生物学研究手段来揭示中医学肺“通调水道”的功能，不仅对于阐明中医学肺藏象功能的内涵具有重要的意义，同时也有助于对解剖学肺认识的进一步深入。

3. 最新进展

在水液代谢研究方面，近年来新分离出的一组具有跨膜转运水的通道蛋白质，称为水通道蛋白（aquaporin，AQP）。研究发现这个蛋白质分子家族有其一定的分布部位和比较明确的作用，到目前为止，在哺乳动物中共发现有 13 种水

通道蛋白，它们广泛分布于机体各种组织细胞中，尤其是与液体分泌和吸收有关的上皮细胞及内皮细胞；参与了机体水的分泌、吸收及细胞内外水的平衡等重要生理活动。

研究表明，在呼吸系统中就有 6 种 AQP。它们是 AQP1、AQP3、AQP4、AQP5、AQP8 和 AQP9。其中 AQP1 主要分布在肺的Ⅱ型上皮细胞和气管、支气管纤毛细胞、汗腺上皮等，它在汗液的排出、气道液体的分泌、气道湿化和肺水肿清除中发挥着重要的作用。AQP3 和 AQP4 主要分布于气道上皮细胞基底膜。AQP5 则分布于肺泡上皮Ⅰ型细胞，其与呼吸蒸腾作用有关。AQP8 和 AQP9 在肺组织中也有表达。研究还发现，肺部的感染和水肿也有肺水通道蛋白的参与。而且 AQP 在参与水液代谢的同时，在维持气道通畅方面也扮演了重要的角色。

现代医学认为泌尿系统是水液代谢的主体。现代研究也证实，与水液代谢有关的水通道蛋白在泌尿系统中同样有分布，主要有 AQP1、AQP2、AQP3、AQP4、AQP6、AQP7 和 AQP8。这些水通道蛋白在肾脏主要参与了水的重吸收和尿液的浓缩过程。在病理的情况下，肾脏水通道蛋白表达的增强会导致水的重吸收增加，液体在体内潴留。而如果水通道蛋白表达减少或基因被敲除，则会导致多尿，甚至尿崩症。更有意义的研究报道是肺在炎症状态或中医肺气虚的状态下，肾脏 AQP1 和 AQP2 也均会出现蛋白质表达的异常。可见，在水液代谢方面，肺和肾是相互联系和互相影响的。

此外，研究还发现 AQP 并非是局部而孤立地发挥作用，它与神经内分泌网络和细胞信号转导系统之间也存在着相互的调节作用。神经内分泌物质如血管升压素（ADH）、肾上腺皮质激素、内皮素（ET）等均可影响 AQP 的表达，而肺脏和肾脏的功能变化也可影响这些激素的变化。这些关于体内水液代谢机制的研究提示，中医学中肺脏的概念已突破解剖学的局限，在完成呼吸、参与体内外气体交换的同时，还参与体内其他的功能活动，比较具有代表性的即调节水液代谢，中医称之为“通调水道”。

4. 主要难点

综上可见，中医学建立在整体论思想基础上的“肺主通调水道”的理论观点，与体内的自我调节机制有关。它不仅有神经内分泌免疫网络的参加，而且还与细胞信号转导等对全身水液代谢方面的调节密切相关，是一个十分复杂的过程，仅仅依靠几项生物学指标作为依据来求证，还不足以得到确认。对它研究的难度体现在：“肺主通调水道”理论的生物学基础涉及从整体到细胞和分子等多个领域，是一个复杂的生物调节系统中的一个部分。

5. 展望

运用现代科技方法，探索祖国医学认识人体生理病理及防治疾病的规律，是

中医现代化发展的重要措施，也是促进中西医结合，相互取长补短的重要手段之一。肺具有“通调水道”的功能是祖国医学对人体肺功能的独到认识之一，蕴藏着十分丰富的科学内涵。尽管中医、西医在认识人体脏腑概念及功能等方面有所不同，但中西医理论的确立都是建立在认识人类生命活动及辨识疾病客观规律的基础之上，因此二者必然存在着许多共同之处。探索、发现这些共同之处，从现代生物学角度揭示中医学这些抽象概念的科学内涵，不仅对于促进中西医结合，提高临床疗效，具有现实意义；同时对于促进中医自身理论的不断发展，亦具有重要价值。从水通道蛋白、神经内分泌免疫网络及细胞信号转导系统等角度入手，来探索“肺主通调水道”的现代生物学机制，有可能成为揭示这一科学难题的突破点。

参考文献

彭永德.2001.神经多肽对肾上腺功能调控的研究进展.国外医学·内分泌学分册,21(4):203～206

王哲,太史春,李淑玲,等.2007.实验性肺气虚对大鼠肾组织AQP-2的表达影响.中华中医药学刊,9(9):1846～1848

Endeward V,Cartron JP,Ripoche P,et al.2006.Red cell membrane CO_2 permeability in normal human blood and in blood deficient in various blood groups,and effect of DIDS.Transfus Clin Biol,13(1～2):123～127

Kreda SM,Gynn MC,Fenstermacher DA,et al.2001.Expression andlocalization of epithelial aquaporins in the adult human lung.Am J Respir Cell Mol Biol,24(3):224～234

Ohshiro K,Yaoita E,Yoshida Y,et al.2002.Expression and immunolocalization of AQP6 in intercalated cells of the rat kidney collection duct.Arch Histol Cytol,64(3):329～338

Song Y,Verkman AS.2001.Aquaporin-5 dependent fluid secretion in airway submucosal glands. J Biol Chem,276(44):41288～41292

Towne JE,Harrod KS,Krane CM,et al.2000.Decreased expression of aquaporin (AQP)1 and AQP5 in mouse lung after acute viral infection.Am J Respir Cell Mol Biol,22(1): 34～44

撰稿人：李宇航　刘晓燕

北京中医药大学

五脏的相互联系

The Correlation of Five Viscera

1. 背景

中医理论体系形成时即有五脏相互联系的论述，其具体的理论、内容与运用，早在《黄帝内经》就有阐述。但作为一个“学说”的提出，则始于20世纪60年代，首倡以“五脏相关学说”来研究中医五行学说及五脏的相互联系。1988年有文献报道了“五脏相关学说”的著名论述，指出在人体大系统中，心、肝、脾、肺、肾及其相应的六腑及四肢、皮毛、筋、脉、肉、五官七窍等组织器官分别组成五个脏腑系统。在生理上本脏腑系统内部、脏腑系统与脏腑系统之间、脏腑系统与人体大系统之间、脏腑系统与自然界和社会之间，存在着横向、纵向和交叉的多维联系，相互促进与制约，以发挥不同的功能，协调机体的正常活动；病理上五脏系统又相互影响。

五脏的相互联系是建立在中医藏象学说等基础理论之上的，体现了中医学的整体观念。其内涵是：五脏在生理上，其物质相互资生、为用，功能上相互依赖、制约，病理上相互损伤、影响。这一理论指导着中医学诊病、防病、治病、养生等过程。其主要特色：一是整体观念。中医理论认为人是以五脏为中心的有机统一整体，五脏之间紧密联系。二是五行相关。中医学认为五脏具有五行的属性，肝属木、心属火、脾属土、肺属金、肾属水，通过五行生克乘侮的关系，解释五脏在生理、病理各方面的联系。三是生理功能。人体的许多生理功能几乎不是某个脏器能单独完成的，须要五脏的通力合作。如情志活动中，心喜、肝怒、肺悲、肾恐、脾思，五脏均参与情志活动。又如气机运动中，肝气、脾气主升，肺气主降、肾气主纳，共同维持气机的升降运动。再如血液运行中心主血脉、肝藏血、脾统血，肾藏精而化血，肺气贯心脉而行气血，共同维持人体血液循环。以上均说明五脏在人体的生命活动中相互关联、密切配合。

2. 科学意义

五脏相互联系体现了中医的整体观，体现了中医学独特的优势。它与现代医学“分析还原”的研究思路相比，更能接近于生命科学的本质。目前针对五脏相互联系的研究主要从生理功能（神经、内分泌、生化代谢、免疫调控）、病理（疾病传变）、临床诊治等多个方面开展。以现代医学的研究模式剖析中医五脏相关的科学实质，容易割裂五脏系统的有机联系，不易挖掘出中医学的特色和优势。

因此，如果能够转变研究思路，建立更好的中医五脏的科学研究模式，真正挖掘出中医五脏的科学内涵，不仅能丰富中医的藏象学说等基础理论，更好地指导中医临床实践；而且能对现代医学生理学、病理学乃至整个生命科学的发展起到极大的促进作用。

3. 最新进展

五脏相互联系及相关的学说近年来广泛运用于中医基础与临床的研究。中医理论基础研究从文献、临床和现代科学机制多个方面，开展了对中医五脏相关理论的深入研究。研究指出：五脏功能有很多超出或不符合五行之性的地方，因此不能仅仅以五行学说的五行之性来类推，应该更多地从五脏功能所主、阴阳属性和气血运化等进行分析，并且从联系模式、联系渠道、联系特点三个方面来说明五脏之间的相互联系。研究归纳了五脏相关学说的五大特点：①在实践的基础上保留“五”的配属系统。人体五脏系统的划分是结构和功能的统一体，并非为配属五行而分成五类，故五脏相关学说保留中医五系统的结构。②以系统和结构的观点认识五脏的相关性。五脏相互联系，是辩证唯物主义关于事物普遍联系观点的体现，其联系的特点可以借助系统科学和结构主义的认识来阐明。③气血阴阳为五脏相关的信息单元和控制因子。五脏相关联的基础不是金、木、水、火、土的五行属性，而是人体气血阴阳等物质与功能相互影响的结果。④证伪与证实相结合，以“症状-病机”的逻辑认识五脏关系。中医对五脏关系的认识，是从宏观的症状中分析病机，从病机中得出脏与脏的相互影响模式。现代实验手段只能起参考作用。⑤以文献和临床调研为依据，开展五脏相关研究。五脏相关学说中的脏与脏之间相关影响的关系式，并非按五行生克公式推导，而应在文献中总结，在实践中验证，并借用现代手段开展大规模调研来逐一明确，最终整合成新的理论体系。

临床研究方面有以下主要成果：①根据五脏相关学说，对中医“脾为生痰之源”的理论进行创新，提出“肝生痰”的理论；②根据五脏相关学说，对子系统“脾肾相关”理论进行深入研究，提出“骨髓间充质干细胞（MSC）为脾肾相关细胞层次表达的存在形式”的假说，探讨补脾益肾法对大鼠MSC增殖和分化的影响，从微观角度和干细胞水平研究脾肾相关性；③将五脏相关学说运用于临床慢型乙型肝炎的治疗，取得了良好的疗效；④从五脏相关理论阐述慢性阻塞性肺疾病（COPD）的临床表现、病因病机等，提出COPD在其发生发展过程中无不与脾、肾、心和肝等脏腑系统密切关联，相互影响；⑤根据五脏相关学说，分别从病因、病机、证治等方面重新认识五脏的单脏、两脏及三脏与阳痿的关系，在整体的原则上认识和掌握阳痿的辨证论治；⑥运用五脏相关理论提出了慢性心衰的辨证论治应根据临床不同证型分别从肺论治、从肾论治、从肝论治、从脾论治的辨治思路。

4. 主要难点

五脏相互联系的研究难点在于其涉及组织发生学、生理功能（神经、内分泌、免疫网络、生化代谢）、病理（疾病）传变、临床诊治，也包括心理现象、情志活动的生理、病理与治疗等诸多方面。既要诠释其现代生物学科学内涵，又要内蕴中医理论精髓，这在研究手段、思辨方式等方法学上提出了极高的要求。

五脏相互联系的研究应遵循中医理论“源于脏而高于脏”、以“象”测“脏”的原则及治疗验证的手段，采用系统科学的思路与方法，依据整体研究思路与方法，重点从五脏功能、病理相关性、治疗验证结果等角度展开。

首先应明确“五脏相关”的确切概念、五脏相互联系的内涵和外延；其次是五脏的生克乘侮，是否指五脏生理、病理相关；再次是研究脏与脏相关、脏与腑相关的机制，包括与五官、七窍、筋脉、皮毛，以及与心理、情志的关系等。通过这些研究，方能破解这一科学难题。

5. 展望

贴近中医理论原义，结合现代生命科学理论与技术，采用从组织发生到生理再到病理及其方药验证的研究思路，从整体效应入手，多途径、多水平，系统地研究五脏相互联系的中医理论内涵及现代生物学本质，将会产生中医五脏相关学说的重大创新性成果。这对中医藏象理论的发展、临床疗效的提高等，将产生深远的影响，具有重要的科学意义和临床应用价值。

参 考 文 献

陈创荣，刘小虹，刘建博. 2008. 慢性阻塞性肺疾病从五脏相关论治. 新中医，(12)：14
邓铁涛. 1961. 如何研究整理祖国医学遗产：与崔宏同志商榷. 广东中医，(4)：165
邓铁涛. 1988. 略论五脏相关取代五行学说. 广州中医学院学报，(2)：74
邓铁涛，郑洪. 2008. 中医五脏相关学说研究——从五行到五脏相关. 中国工程科学，(2)：66
付月箫. 2009. 从五脏相关理论探讨慢性心力衰竭的辨治思路. 光明中医，(10)：8
洪志明，覃湛，陈慰填，等. 2009. 从五脏相关学说试论阳痿的辨治. 广州中医药大学学报，(3)：12
邱勇飞，古继红. 2010. 从五脏相关浅谈肝生痰. 黑龙江中医药，(2)：31
温志鹏，洪志明，陈德宁，等. 2009. 从五脏相关学说重新认识阳痿. 中医药信息，(3)：33
赵亮，李芳，肖会泉. 2007. 慢性病毒性乙型肝炎从五脏相关论治. 新中医，(10)：24

撰稿人：高永翔　周　宜
成都中医药大学

气化如何调节机体

How to Regulate the Human Organism by the Qi Hua

1. 背景

纵观中医学理论体系，从基础理论之阐释到临床各科之应用，气化理论无不反映于方方面面而贯穿于始终，言生理则曰气化作用，言病理、病证则曰气化失常。可见，气化学说是中医学理论中的重要组成部分。气化思想在哲学层面，主要是说明物质形态在一定条件下的变化和转化，在中医学领域则主要限定为精、气、血、津液等各自的新陈代谢及其相互转化。概言之，气化是指通过气的运动而产生的各种变化。

气化思想早在《易经》中已经形成，秦汉时期，气化学说被引入医学领域，用于阐释人体的脏腑功能活动、生化活动和形气转化。《素问》的“七篇大论”则全面、系统地论述了自然界气候的变化以及气候变化对生物的影响，形成了天人相应的运气学说。运气学说所阐述的气候规律对人体生理、病理的影响，实际上是把人体的气化规律置于自然界整体的气化环境和气化规律之中。因此，《黄帝内经》的“气化”理论是把天体运行、数术理论与医学内容结合起来，用于预测气候变化和疾病谱的变化以指导疾病的防治。

2. 科学意义

中医学理论认为，人体的气化活动，推动和调控着精、气、血、津液的新陈代谢及其与能量的相互转化，主宰了脏腑功能活动及人体生命过程，而人体的气化活动与自然界的气化规律又是息息相关、密不可分的。

就人体而言，升降出入是气运动的基本形式。由于气机的出入，才能维持呼吸，摄入水谷之精气，排出粪便糟粕浊物，如此则出入有序，生化不已。而气机的升降是体内物质变化运转的重要方式之一。“清阳出上窍，浊阴出下窍”（《素问·阴阳应象大论》），可使上焦头目七窍得养，下窍二阴通畅和利。水液代谢是人体内直接受到气化调控的非常复杂的生理过程，涉及多个脏腑。概而言之，肺、脾、肾、三焦、膀胱等脏腑之气的升降运动推动着水液在人体内的升降环流与新陈代谢。气化作用的正常，还是神识或灵机健旺的必要前提。就是说，气是一种无所不在流行于天地之间的精灵之气，它既是构成万物的物质材料，也是产生精神活动的物质基础，因而对人的神识灵机具有重要调控作用。气化作用亦是人体正气抗邪的重要环节。人体之气旺盛，脏腑经络功能正常，防御和战胜邪气

的力量就强，则不易受邪而患病；一旦外邪侵入机体，正气能够驱邪外出，使人体恢复健康。可见，阐明气化调节机制的科学意义，在现代科学研究中是一个全新的命题，将对阐明人体的生理病理规律产生革命性的影响，具有非常深远的理论与实践意义。

3. 最新进展

中医学对气化调节机制的研究取得了一定的成果，但主要是在理论研究方面。其观点在于，气化过程是一个自然过程，气化的动力即在于气之本身。气化是气的运动而产生的各种变化，表现在人体系统各要素之间通过制约、选择和协同等相互作用的转化过程。人体系统的自组织性形成了内部结构的相对稳定，这对保持气化过程的连续性起着重要作用。人体的气化活动无论是物质的代谢或能量的转化，应是连续进行而不可须臾中断的。人体的气化活动，包括外受天地之精气，内而生化运行，气与脏腑相互作用，并在相互作用的过程中与周围环境进行着物质能量的不断交换。在整个的气化过程中每一阶段都会有新的物质产生出来，并有新的现象呈现出来，因而是一种不可逆的螺旋式的上升、前进，或渐衰的运动过程，并表现于生命活动的始终。

人体气化活动可能具有如下特点：①气化活动具有“双向性”。气在脏腑气化活动中不断地被消耗，气又在脏腑气化活动中不断地产生和运行。②同化和异化密切相关。在气化活动中，人体吸收自然界清气与饮食水谷，经胃、肠、脾、肺等脏腑气化的共同作用，化生出人体生命活动所需要的基本物质“精气”；在脏腑的气化作用下，人体又能输出能量信息，并排出代谢产物。同化和异化密切相关，贯穿于生命体生、长、壮、老的全过程之中。

4. 主要难点

应当承认，对于人体气化过程中微观世界所存在的“某种东西”人们尚知之甚少，目前的研究尚局限于文献的系统梳理及理论探讨阶段，对于不同层次、不同过程气化的调节机制还缺乏深入研究。进一步的研究应从人体气化运动的许多特殊规律入手，采用现代科学方法，着眼于物质与功能的联系，揭示气化的调节机制。但是，阐明气化的调节机制是一个跨越哲学、自然、医学三大领域的问题，其难度之大显而易见。

5. 展望

气化机制的阐明需要深入研究人体气化活动过程具有的规律性，而现代科学的发展与分子生物学的研究进展有望为此研究带来突破。例如引入统计力学的概念——“熵”，用“气化熵”的理论说明和预测气化活动在人体生命过程中的量化关系就是一种新的设想。

正如一个系统中的信息量是组织化程度的度量，那么一个系统的“熵”，就是它的无组织程度的度量，后者正好是前者的负数。“熵”，表示系统的紊乱程

度。系统越"乱","熵"值就越大;系统越有序,则"熵"值就越小。生命在于运动,并以气化和新陈代谢为主要特征,一个生命过程不仅表现为从有序走向无序乃至死亡的过程,而更重要的是在其生命过程中要努力避免其很快地衰退为惰性的平衡状态。在生命现象中,稳定状态是相对的,不是绝对的。绝对的稳定状态只有在其"气化熵"极大值时方可以见到。一个生命有机体在其生命过程中,始终在不断地增加其"气化熵"值,并逐渐趋于接近其最大"气化熵"值的危险状态直至死亡。气化活动和新陈代谢本质的东西,即是使有机体能够成功地减缓或尽量地消除其自身不同年龄所增加的气化"熵"值。一个旺盛的有机体为使其自身稳定在一个相当高的有序水平的办法,就是要不断地适应其生活环境,规范其气化程序,尽量减缓"熵"值的增加,保持其生命活力。

然而,气化活动过程的量化是很难进行测定的,但如果我们能对机体不同年龄段的脏腑器质损伤和功能减退或紊乱的"熵"值加以量化,从而反推其负"熵",则即可把握气化活动不同年龄段的量化标准。如此研究,是应该能够做到的。如果能在气化如何调节机体的研究方面取得突破,必将对中医学理论的发展与疾病的预防治疗产生重要的推动作用。

参考文献

陈利国.1990.人体平衡问题探讨.山东中医学院学报,11(1):17
冯景远.1984.气与原子——中西哲学物质概念的比较.哲学研究,(6):54
李维武.1988.中国哲学史纲.成都:巴蜀书社出版社
刘燕池,李晓君.2009.试论气化学说的内涵、外延和应用.中国中医基础医学杂志,15(6):401~404
任继愈.1979.中国哲学史.北京:人民出版社
王雨田.1986.控制论信息论系统科学与哲学.北京:中国人民大学出版社
维纳.1963.控制论.北京:科学出版社
伊普里戈金.1987.从混沌到有序.曾庆宏译.上海:上海译文出版社
印会河.1984.中医基础理论.上海:上海科学技术出版社

撰稿人: 刘燕池 李晓君
北京中医药大学

如何解读情志致病

How to Interpret the Diseases Caused by Emotions

1. 背景

情志，即人的喜、怒、忧、思、悲、恐、惊七种情志活动，是人类对外界事件及机体内环境变化产生的情绪情感反应，也是脏腑功能活动的表现形式之一，属于人体正常的生理现象，不会致人生病。不仅如此，人的情绪情感若能适度宣泄，还能舒畅人体气机，调节脏腑功能活动，维持人体的健康。相反，如果情志过激，就会引起病证。随着现代生活节奏的加快、社会激烈的竞争，情志过激病证越来越多。因此，预防情志过激、治疗情志过激引起的病证，是当代医学的重要任务。

2. 科学意义

情志学说（又称“七情学说”）是中医理论体系中非常重要的概念。随着现代医学模式的转变，愈加显示出情志学说理论的优越性。但是，情志过激引起病证的机制，至今尚未完全阐明。因此，阐明情志过激致病的机制，对于防治情志过激病证、维护人类健康具有重要意义。

3. 最新进展

情志过激所致病证，一般称为情志病证。中医关于情志过激致病的机制可以概括为以下四个方面：

一是滞碍气机。人体的气，是不断运动着的具有很强活力的精微物质，它流行于全身各脏腑、经络等组织器官，无处不到，无处不有，时刻推动和激发着人体的各种生理活动。气的运动，称作“气机”。

情志过激，常常影响脏腑气机，尤其是肝对气的疏泄功能，使体内气的运行紊乱，从而导致疾病。《灵枢·寿夭刚柔》说，“忧恐忿怒伤气，气伤脏，乃病脏”，指出情志过激，就会导致气机失调，从而引起脏腑功能失常的病证。气机的紊乱，主要表现为气滞、气逆、气闭等形式。故《素问·举痛论》说，“怒则气上”、“喜则气缓”、“悲则气消”、“恐则气下”、“惊则气乱”、“思则气结”。

二是耗及精血。情志活动虽然是脏腑功能活动的外在表现或反应，但脏腑维持其正常功能活动必须依赖于所藏之精血的滋养、濡润。故脏腑所藏精血，是情志得以发生的物质基础。

情志过激，必然耗伤精血，导致精血亏损，从而引起一系列精血亏损的病

证。精血同源，伤精即所以伤血，故《素问 • 疏五过论》说，“暴乐暴苦，始乐后苦，皆伤精气，精气竭绝，形体毁沮”；“离绝菀结，忧恐喜怒，五脏空虚，血气离守”。《灵枢 • 本神》说：“恐惧而不解则伤精，精伤则骨酸痿厥，精时自下。”

三是损及阴阳。《黄帝内经》非常重视人体阴阳的相对平衡及阳气的主导作用，认为阴阳相对平衡是机体正常生理活动的基础和保证，也是情志正常活动的前提。故《素问 • 生气通天论》说：“阴平阳秘，精神乃治。”

人体的阴阳，是相互资生、相互依存、相互促进、相互为用的两个方面，并共同维系着人的生命活动。情志活动是人的生命活动的一部分，阴阳双方的和调，则是维系情志正常活动的基础。因此，情志过激可以损及阴阳，导致阴阳失调，从而引起阴阳失调的病证。故《素问 • 阴阳应象大论》说：“暴怒伤阴，暴喜伤阳。”《素问 • 生气通天论》说：“阳气者，大怒则形气绝，而血菀于上，使人薄厥。”《素问 • 调经论》说：“喜怒不节则阴气上逆，上逆则下虚，下虚则阳气走之。”

四是伤及脏腑。《素问 • 阴阳应象大论》说：“人有五脏化五气，以生喜怒悲忧恐。”说明情志活动源于脏腑功能活动，是脏腑功能活动的外在表现，脏腑是情志发生和调控的关键所在。因此，情志过激，均可内伤脏腑，导致脏腑功能失常。故《素问 • 阴阳应象大论》说：肝“在志为怒……怒伤肝”；心“在志为喜……喜伤心”；脾“在志为思……思伤脾”；肺“在志为忧……忧伤肺”；肾“在志为恐……恐伤肾”。《灵枢 • 本神》说：“心怵惕思虑则伤神，神伤则恐惧自失”；“脾愁忧而不解则伤意，意伤则……四肢不举”；“肝悲哀动中则伤魂，魂伤则狂妄不精，不精则不正”；“肺喜乐无极则伤魄，魄伤则狂，狂者意不存人”；“肾盛怒而不止则伤志，志伤则喜忘其前言”。情志过激的初期，以伤肝为多见。故魏之琇《柳州医话》王士雄按：“肺主一身之表，肝主一身之里。五气之感皆从肺入，七情之病必由肝起。”

由此说明，情志学说与人体的阴阳、精血、脏腑理论结合为一个整体，情志与情志之间存在着相互协调、相互制约的密切关系；情志过激致病与人体气机、阴阳、精血、脏腑密不可分，治疗情志过激的病证既可以利用情志与情志之间相互制约的关系而达到以情胜情的目的，又可以通过调整人体的气机、阴阳、精血与脏腑功能而恢复其相互协调的生理状态。

近年来的研究表明，情志过激致病的机制主要有以下三个方面：①导致神经功能紊乱。在激烈的情绪刺激下，部分大脑皮质、丘脑系统、边缘系统、交感神经系统发生不同程度的功能紊乱，引起中枢神经系统、自主神经系统一系列的生理病理反应。②导致内分泌功能紊乱。在激烈的情绪刺激下，下丘脑-垂体-肾上腺轴功能紊乱，导致下丘脑、垂体、肾上腺分泌异常，机体内环境的稳定被打

破，从而引起心血管系统等一系列的生理病理变化。③导致免疫功能紊乱。在激烈的情绪刺激下，补体 C3、IgA、IL-2 水平下降，T 细胞及脾淋巴细胞转化率降低，T 细胞功能抑制，导致机体免疫功能下降。

4. 主要难点

研究的主要难点是：①情志概念的标准化和规范化问题；②情志如何由模糊定性转变为精确定量的问题；③情志与心理、意识、情绪相关，但又不能归结为单纯的心理、意识、情绪的问题；④情志与机体体质、神经-内分泌-免疫相关，但又不能归结为单纯的体质或神经-内分泌-免疫网络的某个环节的问题。这些都是情志内涵及其致病机制研究的难点。

5. 展望

对于情志致病目前已经受到广泛的关注，科学家们分别从神经、内分泌、免疫等方面进行了初步的较有意义的探索。当前的研究发现人的感情与健康的关系十分密切：微笑会让身体释放出免疫的化学物质，增强身体对疾病的抵抗能力；大笑能帮助缓解内心的痛苦，据说与提高大脑内的吗啡水平有关。这些科学的探索说明，虽然目前对中医有关情志致病的确切机制尚不明了；但是展望未来，在中医学整体观理论指导下，把握七情与人体阴阳、精血、脏腑之心身一体、形神一体的本质内涵，围绕七情过激易于滞碍气机、耗及精血、损及阴阳、伤及脏腑等致病特点，基于中华传统人文文化，借鉴现代心理意识情绪理论与神经-内分泌-免疫网络学说研究成果，从心理生理、意识情绪与体质禀赋、机体反应性等方面开展综合研究，将可揭示七情致病的奥秘。

参考文献

郭霞珍.2009.中医基础理论专论.北京:人民卫生出版社,138～142
李浚川.1994.情志医学.北京:中医古籍出版社,71～82
刘燕池,郭霞珍.2002.中医基础理论.北京:科学出版社,140～141
孟昭兰.2005.情绪心理学.北京:北京大学出版社,2～8
乔明琦,张惠云.2009.中医情志学.北京:人民卫生出版社,307～311
孙广仁.2002.中医基础理论.北京:中国中医药出版社,225～229

撰稿人：周安方
湖北中医药大学

六淫内涵与疾病

Six Exopathogens Intension of Chinese Medicine and Diseases

1. 背景

六淫，是风、寒、暑、湿、燥、火（热）六种外感病邪的总称。六淫概念源于六气，是在古代一切致病因素都是“气”演变的哲学背景下形成的。《黄帝内经》将风、寒、暑、湿、燥、火（热）六种正常气候变化概称为“六气”，认为六气分治四时，四时气候变化是万物生长化收藏的条件，一般不会使人发病。而六气变化异常，致人发病则称六淫。“六淫”一词首见于宋·陈无择《三因极一病证方论》，他将外感致病因素称为六淫。“淫”泛指气候反常，风、寒、暑、湿、燥、火太过或不及，变生六淫。在此基础上逐渐形成了中医的六淫病因学说。

2. 科学意义

六淫病因学说将自然环境因素（季节气候、地域）与人体发病反应性结合起来，通过“辨证求因”来认识六淫病因，体现了中医病因学上的整体观念，对于研究季节性多发病、外感病的辨证论治以及气象、环境变化对于人体健康与疾病的影响具有重要的指导意义，对于现代气象医学、环境医学、时间医学、传染病学都有重要的启示作用。

3. 最新进展

目前研究认为，六气反常是其成为六淫病因的条件，而人体功能失调是六气变生六淫的内在根据。《黄帝内经》认识六淫病因的方法，一开始就通过采用临床表现结合季节环境因素为依据的方法，确立了病因研究的“辨证求因”法则。六淫病因学说的理论基础是“ 四时五脏阴阳”理论，尤其是天人相应，气候季节、环境阴阳相应。人体五脏与外界自然环境存在着“通应”、“收受”关系。风、暑、湿、燥、寒内应肝、心、脾、肺、肾五脏，并与春、夏、长夏、秋、冬五季相应，因而在五行系统对应的六淫之气和五脏之间存在有特殊的易感性，表现为“四时之气，更伤五脏”之时有其本身的特点。

六淫病因的内涵，不能单纯理解为四时不正之气，还包括生物致病因素、理化损伤、体质、机体反应性等，实质是指外界致病因素作用于人体所引起的六种病理证候；六淫概念具有病因、病理双重意义；六淫致病实际上包含了体质、病种、致病因素等的综合作用。六淫是指直接或间接受六气（自然气候）影响，导致或诱发、加重疾病的所有因素，既包括受气象、气候影响的生物性、化学性、

物理性致病原，亦包括受气象、气候影响的机体免疫状态、病理生理状态。六淫概念的综合性内涵，反映了中医病因学说的物质性、条件性和机体反应性这一基本特色（图1）。

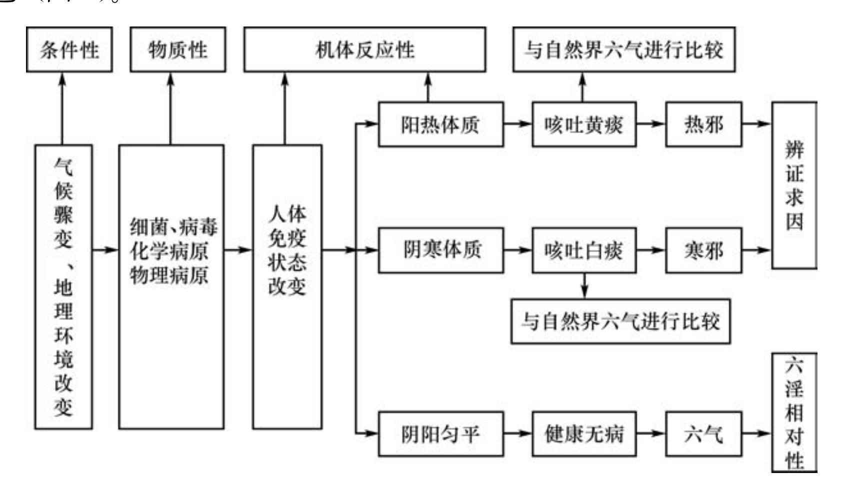


图1　六淫内涵现代认识示意图

近年来，针对六淫致病机制的研究主要从六淫与气象、地理环境、致病微生物、理化损伤的关系，六淫影响机体体质、神经-内分泌-免疫等方面展开，如“六淫”气象因素实际为风、温度、湿度三种气象要素和气候因素，对于人体生理活动的影响表现在体温调节、热能代谢、内分泌及消化器官、关节生理等方面。“六淫”气象作用于人体所产生的疾病，是通过自主神经系统的活动及下丘脑等中枢神经系统的调节控制而完成的。气温还影响人体热平衡代谢、影响人体气化过程；气温对人体物质代谢、气机、气血运行、免疫功能均能产生影响；气候和体质与疾病的发生类型密切相关等，但其本质内涵和致病机制仍尚未明了（图2）。

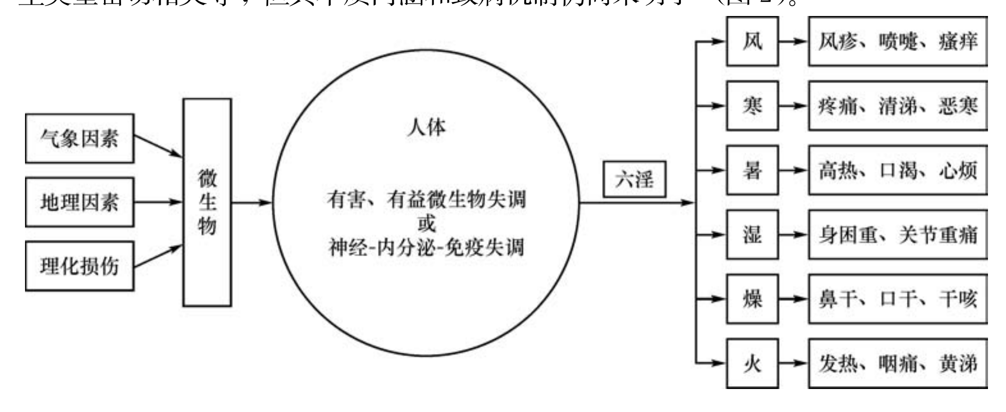


图2　六淫致病机制示意图

4. 主要难点

“六淫”内涵研究难点在于：①六淫概念的标准化和规范化；②六淫与外界气象、地理环境、致病微生物相关，但又不能归结为单纯的气象、地理、致病微生物、理化损伤；③六淫与机体体质、神经-内分泌-免疫相关，但又不能归结为单纯的体质或神经-内分泌-免疫网络的某个环节；④六淫是定性描述，难以精确定量。这些难点是六淫内涵现代研究的瓶颈。

目前，大部分的六淫致病的机制远没有得到阐述。主要难点在于：①六气转化为六淫的生物学基础；②六淫致病或相兼为病的病理生理学基础；③六淫与体质、机体反应性相互作用的病理生理学基础；④六淫转化的病理生理学基础；⑤六淫与季节相关性及不同季节疾病易感性的生物学基础；⑥六淫与五脏相通的病理生理学基础。

5. 展望

解决上述问题必须重视整体性研究和实验设计。六淫邪气致病，是由自然的六气转化、六淫邪气和机体正气三者之间的相互作用状态决定的。六淫致病从根本上说，就是研究环境改变对生物的影响作用。该影响作用使得机体与体内外微生物协调关系被打破，便导致了不利于整个宿主生命正常运行的综合状态的形成。基于这种相互作用来认识六淫致病性，为认识六淫致病提供了新思路。

解决六淫致病的可行思路是：从六淫气象或地理环境或理化损伤入手，研究不同气象因素或地理环境或理化损伤条件下，体内外有益和有害微生物变化规律及机体神经-内分泌-免疫变化情况，进而探讨气象-地理-理化损伤与微生物及机体反应性三者之间的相互作用机制。只有这种整合研究才有望获得突破。

对于未来六淫致病的研究，应该借鉴现代时间医学的研究成果，从季节、气象、生物、理化损伤、体质、机体反应性、应激等方面综合实验和研究，即从季节、环境（气象、地理）变化如何导致生物及理化物质的改变，又如何影响人体神经-内分泌-免疫-体质-应激系统，进而“外内合邪”导致外感疾病或五脏疾病发生上进行系统性实验设计与研究，以期破解六淫致病之谜。

参考文献

冯前进，窦志芳，耿炤，等.2007.中医学扶正祛邪治则预防和治疗病毒感染性疾病和抗病毒药物设计的一个新策略.山西中医学院学报，8（1）：2～6

黄广平.1999.六淫、气象与体质关系浅探.山东中医药大学学报，23(4)：42～43

贾新华，张伟.2003.寒邪与气象因子相关性分析.山东中医药大学学报，27(6)：404～405

李连方，尚品洁，杨金莲.1999.“六淫”致病的科学性及定量标准探讨.气候与环境研究，4(1)：87～88

刘力红.2007.不同视角探病因——谈六淫与微生物.中医药通报，6(1)：41～42

陆保磊.2003.六淫新识.山东中医杂志,22(10):581～582
张登本,孙理军,李翠娟.2006.《黄帝内经》六淫理论的发生及其意义.中医药学刊,24(11):1981～1982
郑红斌,张光霖.1999.中医病因古今演变的研究之四——《内经》六淫病因学说概要.浙江中医学院学报,23(6):4～5

撰稿人：马淑然
北京中医药大学

中医望诊的诠释

The Explanation of Looking Examination in TCM

1. 背景

中医诊病，主要靠望、闻、问、切四种方法，简称为“四诊”。通过这四种诊断方法，可以诊察疾病表现在各个方面的症状，从而了解疾病的病因、性质，为进一步辨证论治和处方用药提供依据。因此，中医四诊是中医辨证与治疗的根本依据。望诊在四诊中居于首位，在中医诊断中有重要的作用和意义。望诊就是对患者整体和局部的神、色、形、态，以及分泌物、排泄物的形、色、质、量的变化进行有目的的观察，从而了解机体疾病或健康状况的诊断方法。《难经》中说“望而知之谓之神”，望诊在临床辨证论治中占有极为重要的地位，通过望诊，我们能掌握更丰富的信息资料，对病情有更深刻的认识。在中医发展的几千年历史中，历代医家对望诊都极为重视，《灵枢 · 本脏篇》中指出“视其外应，以知其内脏，则知所病矣”；现今较完整的望诊著作《望诊遵经》中也提出“治病必先知诊，诊病必先知望”。

2. 科学意义

时代在不断发展，科学在不断进步，技术手段在不断提高，如何使望诊跟上时代的步伐？怎样将现代科技的思路、方法与手段在望诊中全面应用？中医人最终能否实现望诊的科学发展？近年来中医工作者进行了各种尝试，证明上述各种问题解决的关键在于“中医望诊的原理能否被科学阐释”，只有科学阐释了中医望诊原理，才能形成合理的望诊框架体系，才能灵活主动地将现代科学技术纳入到望诊的框架体系中。

3. 最新进展

中医望诊原理包括三个方面：司内揣外、见微知著、以常达变。这三个方面是以五脏为中心、以气血精津为载体的整体生命观为基础的，这种整体生命观认为体表任何一个相应的局部都有可能反映身体脏腑的生理病理信息。

“司外揣内”是从局部到整体、从现象到本质的思维方法。揣，即揣测，是根据人体生理、病理现象，揣测生命运动所处状态的逻辑思维活动，是通过对生命现象的观察、辨认，形成感性认识，进而发现并归纳生命状态的本质属性与表现于外的现象的固定联系，进而取类比象进行归类判断。科学发展至今，司外揣内的研究主要在三个方面有一定发展：首先将司外揣内的科学内涵与近代的黑箱、白箱、灰箱理论相联系；另外不同领域的医学工作者，将“外”的外延有所

扩展，如生化检查指标、内镜检查指标的纳入；部分中医工作者将采集“外”在信息的手段进行了改进，如用测色仪、色差仪、红外热像仪等设备的研发。虽然有了上述几个方面的探索，但根本问题仍然尚未解决：①司外揣内的科学内涵解释尚显单薄，可运用自然辩证法、控制论、信息论、系统论、辩证逻辑、模糊集合论等多学科知识相结合对司外揣内的内涵进行具体阐释。②“外”的外延的扩展尚缺乏系统性、有效性和客观性，当多学科知识交叉运用，综合探讨能将现代检测指标纳入望诊框架的有效体系。③“外”的信息采集手段虽有所改进，但目前多处于研究阶段，缺乏临床实践性，此类手段的研发当密切结合其临床应用价值。

“见微知著”有两层含义。其一指机体的某些局部可反映整体的生理病理信息，通过微小的变化、可以测知整体的情况，如中医的舌诊、脉诊、目诊等。现代研究的发展将该方法与当代“生物全息”的思想相联系，同时也在原有微观诊法的基础上进一步实现了细化，但目前该原理的研究与司外揣内的研究阶段一致，尚未出现理论上或应用上根本性的或者系统性的突破。其二指通过发现某些微小的变化，预知病变的显著性，做出早期诊断，现代研究认为此理念与现代医学的早诊断、早治疗不谋而合，但是随着现代疾病谱的改变，中医用于预测疾病的“微”指征如何发展，如何将现代科技的微观指标兼收并蓄，是进一步研究中所需关注的问题。

在“以常衡变”中，“常”指健康的、生理的状态，“变”指异常的、病理的状态。以常衡变，是指在认识正常的基础上，发现太过或不及的异常变化。中医诊断疾病时，重视从正常中发现异常，从对比中找出差别，并进而认识疾病的本质，从而实现以我知彼，以观太过不及。然而，与现代医学的金标准、参考值等相比，中医的“常”的规定是模糊的、相对的，不确定的，从而难以实现诊断的客观化、规范化，至今尚未有所突破。因此，中医四诊的“常”，即“标准”怎样制定，是中医望诊原理研究的另一关键，是中医实现诊断规范化、标准化的前提，是中医临床疗效突破的切入点之一。

4. 难点

世界日新月异，科学技术不断革新，各学科迅速发展，中医临床工作中大量引进和运用现代诊断技术与设备，为中医诊断的发展提供了机遇，也提出了挑战。对于上述望诊原理的研究是机遇，还是挑战，取决于中医工作者对该问题的认识程度、认识方式，以及应对策略的设计。通过上述分析我们认为，中医望诊原理的研究问题及应对方案主要涉及以下几个方面（图1）：

（1）如何将中国古代哲学思想与现代辩证唯物主义哲学思想相结合系统阐释三大原理的哲学内涵。

（2）如何利用现代控制论、信息论、系统论、辩证逻辑、模糊集合论等多学科知识相结合对三大原理的现代涵义进行阐释。

（3）如何利用多种现代生化检查指标及内镜检查方法对三大原理的外延进行系统扩展。

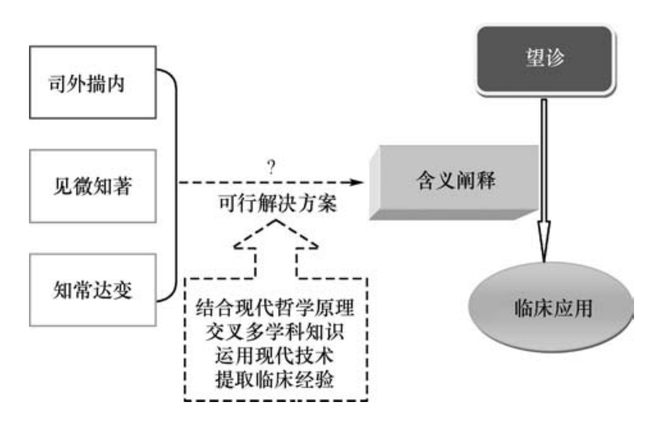


图 1　中医望诊原理研究示意

(4) 通过三大原理研究，已经实现了部分望诊手段的升级，如何进一步将科学研究与临床实践应用密切结合起来。

5. 展望

中医源远流长，自古至今靠的是中医兼收并蓄的原理框架。在中医前辈的不懈努力下，望诊原理随着时代发展不断吐故纳新，日新月异。当今社会，中医面临着机遇与挑战，望诊乃至四诊原理将是中医诊断乃至中医治疗发展的依托，是中医实现客观化、规范化与现代化的关键所在，如何解决好这一科学问题，是中医继往开来、生生不息的重要基础，是中医临床疗效步步攀高的动力源泉。

参 考 文 献

曹宁芳 .2001 .浅议生物全息律与中医望诊 .陕西中医 ,22(11):676～677
杜松 .2009 .《黄帝内经》望诊的理论探讨 .中国中医基础医学杂志 ,15(6):411～412
高洁 .2008 .从司外揣内论中医诊断方法 .中国中医基础医学杂志 ,14(8):580～581
郭霞 ,瞿岳云 ,王辉 .2005 .浅谈中医诊断学的研究思路 .中医药导报 ,11(1):15
赖世隆 ,杨小波 ,温泽淮 .2005 .证候宏观诊断标准基本框架的探讨 .中国中西医结合杂志 ,25(6):552
罗雄 ,凌湘力 .2005 .从“中医研究”与“研究中医”谈中医现代化 .贵阳中医学院学报 ,27(2):7～9
梅晓云 .2001 .司外揣内的辨证方法 .江苏中医 ,22(10):5～6
孙睦 .2007 .现代中医诊断和西医诊断的比较与思考 .中华现代中医学杂志 ,3(3):214～215
王庆华 ,陈莉 .2008 .浅析中医四诊中的望诊 .国医论坛 ,23(2):14～15
王小平 .2006 .中医客观化研究存在的问题及对策 .山东中医药大学学报 ,30(6):430～431

撰稿人：李　峰　宋月晗
北京中医药大学

中医证的诊断与疾病

Syndrome Identification of TCM
and Disease of West Medicine

1. 背景

证是中医学特有的概念，是对疾病所处一定阶段的病因、病性、病位及病势等的概括，表现为特定症状、体征的有机组合。辨证论治是中医学诊治疾病的特色和精华所在，体现了因人而异的个体化诊疗思想。由于传统中医对证的确定是建立在望、闻、问、切的基础上，同时辨证过程受医家主观经验的影响，使得辨证的精确性和重复性较差，一定程度上制约了中医诊断和治疗水平的提高与学术的发展，因此建立较为统一、可行的证的诊断标准，一直是中医研究的热点和难点。对于证诊断标准的模式与结构目前虽无统一的定论，但在病证结合模式下进行证的诊断研究已经成为一种趋势。

病与证是密切相关的不同概念，对疾病本质反映的侧重有所不同。辨病有利于从疾病全过程、特征上认识疾病的本质，重视疾病的基本矛盾；辨证则重在从疾病当前的表现中判断病变的部位与性质，抓住当前的主要矛盾。辨病和辨证的差异性和互补性，使得两者的结合成为必然。

2. 科学意义

言及病证结合，既指中医辨病与辨证相结合，也包括西医辨病与中医辨证相结合。中医在长期的实践活动中虽认识到许多疾病，但受认识方法和历史原因的限制，其大多数病名是以临床常见症状、体征命名的，不利于反映疾病的本质。而西医的病名较为规范，诊断标准较为明确，临床应用时操作性较强，容易达成共识，因此目前所言病证结合，多指将西医的辨病与中医的辨证相结合。病证结合，以病限证，既可增加辨证的准确性，又可加深、补充对疾病的认识。因此，辨病与辨证有机结合、取长补短，不仅有利于提高中医临床辨证论治水平、促进中医现代化，而且也可促进对西医疾病的进一步认识。

3. 最新进展

20 世纪 50 年代以来，人们吸取和借鉴现代多学科的理论、思想及最新技术手段和方法，从不同角度、不同层次，开展了证的诊断标准研究。但由于受中医学科特点及方法学等因素的影响，迄今为止，尚未建立起可广泛推广和应用的辨证标准。目前多将文献分析、临床流行病学调查、数理统计分析、专家咨询等结

合起来开展病证结合模式下的证诊断标准研究。①文献分析：辨证论治体系就是古代医家在临床实践过程中不断形成和完善的，对历代中医典籍进行系统发掘整理、阐释评价，是建立中医证诊断标准的必要前提；借助网络信息化平台对公开发表的相关病、证文献资料进行系统整理和分析，是认识当前有关西医疾病与中医证关系的一条有效途径。②临床流行病学调查：按照循证医学的原则，通过临床流行病学调查，收集西医某一疾病的中医证、症表现特点及分布特征，可为建立证诊断标准提供较为客观的依据。③数理统计分析：近年来的一些研究已将聚类分析、结构方程模型、基于熵的关联度理论、神经网络、隐结构法等数理统计分析方法尝试运用到证的诊断标准研究中，在一定程度上增加了研究结果的客观性。④专家咨询：通过专家问卷调查和组织专家论证等形式，在充分吸取专家、学者丰富经验及建设性意见的基础上，形成专家共识也是建立证诊断标准的有效途径之一。该方法既能反映现代中医的学术水平，也能在一定程度上确保诊断标准的权威性和先进性。目前已有不少学者尝试采用上述思路，选取一些临床常见、中医药治疗优势明显的病种（如冠心病、高血压、中风、慢性乙型肝炎等）作为研究对象，将文献分析、临床流行病学调查、数理统计分析、专家咨询诸法结合，建立病证结合下证的诊断标准，进一步促进了对病、证的认识。

4. 主要难点

病、证结合模式下证的诊断，既要反映病的本质与特异性，又要体现证的状态性、动态性与灵活性，其诊断标准应具备科学性、实用性、继承性、发展性、区别性、稳定性的特点。因此，在对病证结合下证诊断的研究过程中，需要不断探索西医疾病与中医的证之间的相关性及交叉点，找寻建立病证结合证诊断标准的最佳模式，并通过评估—修订—再评估—再修订等环节，使其诊断标准逐步完善。

5. 展望

中医与西医虽属不同的体系，但其研究对象都是人体，因此，随着研究的不断深入，人们对于西医的疾病与中医的证之间关系的认识有望逐步突破，深层次的病证结合也有望逐步实现。

参 考 文 献

高怀林，吴以岭，陈静，等．2009．基于熵的分划方法在中医证候研究中的应用．系统仿真学报，(6)：459～461

申春悌，陈启光，张华强，等．2008．结构方程模型在异病同证研究中的运用．中国中医基础医学杂志，(12)：953～958

王天芳，杜彩凤，王庆国，等．2009．基于证候要素及病证结合建立证候诊断标准的思路．中西医结合学报，7(10)：901～906

王天芳，张连文，赵燕，等. 2009. 隐结构模型及其在中医证候研究中的运用. 北京中医药大学学报，32(8)：519～526
王忆勤. 2004. 中医诊断学. 北京：中国中医药出版社，232
袁肇凯，王天芳. 2007. 中医诊断学. 北京：中国中医药出版社，3
张连文，袁世宏，陈弢，等. 2008. 隐结构模型与中医辨证研究(Ⅱ)：肾虚数据分析. 北京中医药大学学报，31(9)：584～587

撰稿人：王天芳　吴秀艳
北京中医药大学

中医证候的科学内涵是什么

What Is the Scientific Connotation of TCM Syndrome

1. 背景

证候，是疾病过程中某一阶段（时点）机体对内外致病因素作出的综合反应，在宏观上表现为特定症状、体征的有机组合。反映了疾病的病因、病位、病性以及邪正相争的状况和趋势。证候是中医学特有的诊断概念，既是对患者整体功能状态反应的认识和把握，又是患者个体特性的体现，能够更为明确地指导临床治疗，提高临床疗效。证候贯穿于中医学养生保健和疾病治疗过程中，是中医优势与特色最重要的体现点，是对现代疾病诊断的有力补充。随着医学模式的转变，人类医学也越来越重视宏观、综合的研究，越来越注重个体化诊疗，证候的研究可能会解决很多目前医学所不了解的疾病发生规律，推动医学发展到一个新的水平。

2. 科学意义

证候是中医特有的概念，由于历史条件的限制，其多采用描述性的语言进行阐述，是一个不可直接测量、缺乏客观的标准、物质基础尚不明确、高度复杂的多维概念。正是由于证候概念的复杂、模糊，影响了临床诊疗研究的大规模深入发展，影响了中医学术交流的推广，而且给中医理论的传承带来了一定的困难。开展中医证候研究、揭示其现代科学内涵，一直是中医学术研究的核心内容，也是中医学向客观化和科学化迈进的重要基础，对证候科学内涵的研究，可能会解决很多目前医学所不了解的疾病发生规律，推动医学发展到一个新的水平。

3. 最新进展

为了解决此项难题，中医界的众多学者开展了广泛的证候研究工作。研究者最初的设想是希望通过实验室技术寻找到证候特异性、诊断性指标，验证证候的客观存在性，揭示证候的科学内涵是什么，并建立证候诊断的“金标准”。在这种研究思路的指导下，研究者从五脏证中肾本质的研究起步，紧跟现代医学科技发展的前沿，从自由基到神经、体液、免疫，从器官到组织，从细胞到神经生物学，进行了漫长的探索研究。20 世纪 60 年代初，肾本质研究取得了初步成果，即发现多种疾病诊为肾阳虚证有同一类客观指标的相同改变，引起了很大的反响。70 年代，肾本质的研究继续，阴阳等八纲证候亦在寻找新的检测指标，脾脏相关证候和血瘀证本质的研究也相继启动。到了 21 世纪，基因组学、蛋白质

组学的出现，又给证候研究提供了一条新的研究思路，诸多学者逐步开展了证候的基因或蛋白质组学研究，希望能在基因和蛋白质分子层面揭示证候的科学内涵。但此方面的研究还刚刚起步，尚未能揭示证候的科学内涵。

4. 主要难点

自 20 世纪 50 年代至今，证候的科学内涵研究已进行了半个世纪，证候研究的难度与复杂性远远超出人们的预想，远未达到预期的结果，仍然无法对证候的科学内涵给出较为清晰的界定。一方面证候横跨多个病理环节，有着多方面的物质基础，其科学内涵存在着高度复杂性，其微观特征不可能是一个或几个指标，而是一组指标的平衡体；其宏观特征不仅是几个症状有无差异，而是症状体系在不同患者身上的个人化体现；另一方面，证候还包涵很多人文内涵，如医生的知识结构、患者的情绪、当时的气候天气条件、社会环境等诸多因素。因此，证候科学内涵的研究具有极大的难度。目前证候科学内涵研究的主要难点是：一方面，技术上缺乏创新。以往个别指标的实验室研究很难体现证候的特异性，需要大样本的组学、系统生物学研究技术；而现有的信息分析技术也不完全适用于证候数据，需要多种数据分析方法的整合与提升。另一方面，证候的研究模式缺乏突破。现有的证候研究模式比较单一，缺乏新的研究思想，新的研究模式的突破。随着研究的日益深入，在众多研究人员的努力下，证候科学内涵必将日新月异，突破难点取得实质性的进展，揭示证候的现代科学内涵，为中医研究的国际化进展开辟道路，奠定基础。

5. 展望

在实验室研究未能取得突破的同时，随着医学全球化交流和多学科交叉研究的不断渗透，特别是现代信息学的高速发展，为解决证候科学内涵的研究带来了新的思路，注入了新的活力。

近年来，研究者吸取和借鉴现代多学科的理论、思想及最新技术手段和方法，从文献、临床和实验等不同角度，从宏观与微观的不同层次，围绕证候的科学内涵开展了大量的现代研究。如通过调查、分析古今文献，并结合临床实际情况，对症、证、病及其三者间的关系进行规范；从一般性临床观察，逐步过渡到基于临床流行病学的群体调查方法、探索证候的分布及动态演变规律、建立证候的诊断标准等。例如，运用 SAS 软件对 223 例患者进行系统聚类和主成分分析，并结合专业知识对肝炎肝硬化中医常见的证候做出判别；根据 163 例类风湿关节炎患者头发微量元素的检测结果，采用动态聚类法在多维空间进行分类，可以得出五种证型；对 221 例中风急性期患者证候特点等进行了指标聚类，结果可分为四类；对 545 例确诊为肝炎后肝硬化患者临床信息进行因子分析，初步提取了六个“单元证”；构造了一个神经网络分级系统，并用于类风湿关节炎寒热错杂证的病情分级诊断，初步探讨了神经网络用于中医诊断的可行性；经研究表明，神

经网络用于证候的规范化研究具有方法上的可行性等。

通过这种基于群体调查的临床研究，借用信息学、计算机、数理统计、数据挖掘等技术对临床信息进行分析，可以寻找临床证候的外在表现特点及发展规律，而通过对证候外在规律的总结必将对揭示证候的科学内涵具有意义。

另外，随着研究的不断深入，研究者亦逐步发现证候诊断中包含了环境因素、社会因素及其他主观因素，故而探索将特殊的环境、心理、社会等因素亦同步纳入研究，与症状、体征指标一起分析。如将应用心理量表、性格量表、生活事件量表等方法采集的患者的主观信息纳入数据库与症状信息一同分析；如应用决策树分析的方法挖掘医生诊断的思维模式等。这方面的研究仅是个别学者的探索，尚未有文章发表，但此方面的研究必将成为证候研究的有力补充，对全面揭示证候内涵具有十分重要的意义。

参 考 文 献

边沁，何裕民，施小成，等．2001．基于 MFB-P 算法的中医证型的神经网络模型初探．中国中医基础医学杂志，7(1)：386～389

陈家旭．1998．中医“证”研究的回顾与展望．北京中医药大学学报，21(1)：40～43

邓兆智，何羿婷，余煜棉，等．1996．计算机模式识别法在类风湿性关节炎中医证候诊断与常规临床判断的比较．中国中西医结合杂志，6(12)：727

顾学兰，刘平，陈家慧．2005．肝炎后肝硬化单元证的多元统计分析．中国中医药信息杂志，12(10)：3～5

梁雄伟，温泽雄，欧爱华，等．1998．中风急性期中医证候多元分析．广州中医药大学学报，15(4)：293

秦建增．2004．对证候基因组学研究的思考．中国中医基础医学杂志，10(5)：17～18

张琴，刘平，曹素华，等．2003．肝炎后肝硬化中医证候的多元分析．中西医结合肝病杂志，13(2)：69～72

周志坚，毛宗源，邓兆智．1999．神经网络在类风湿性关节炎病情分级中的应用初探．生物医学工程学杂志，16(4)：479～482

撰稿人：王庆国　赵　燕

北京中医药大学

解读中医学的“天人相应”整体观

What Is the Scientific Meaning of “Relevant Adaptation of the Human Body to Natural Environment” in Chinese Medicine

1. 背景

“天人相应”，与中国哲学的“天人合一”观同理，是对天人关系的一种认识，它的核心是强调“天人一物，内外一理”，即指自然与人共为一物，存在同一性相关规律。这个涉及认识论的命题，在自然科学技术相对落后的古代社会，对中医学从物体本身去认识生命的本质有着不可忽视的作用。

医学的研究对象是人，因此“天人相应”、“天人一理”的思想，在中国医学形成之时就具有主导作用。大家知道现存最早的阐述中医理论的典籍《黄帝内经》一书，其中《素问》部分一共 10 余万字，有 5 万多文字涉及天人相应的相关理论；81 篇中直接阐述“天人相应”整体观思想的篇章达 20 余篇之多。如《素问・宝命全形论》“人以天地之气生，四时之法成”的相关论述不仅占有大量篇幅，也是贯穿全书的一条主线。这种人与自然相关的理念，一直影响着中医界对自身理论的研究和临床实践的指导，至今中医界公认中医“天人相应”整体观是中医理论体系的主要特征之一，也是有别于西方医学理论的一个重要方面。那么其科学内涵是什么？对中医学理论体系的形成与发展有何意义与价值？这些问题值得思考和探索。

2. 科学意义

以“天人相应”整体观为基础，中医学提出，人体是与自然相合而形成的生命体，其生命活动现象与自然万物的变化具有共振协调的同一性。古代医家还通过观察自然时序变化，万物之象顺时而异的规律；把人体与自然两者可见之“象”结合起来，从表达于外的“象”去观察探讨内在脏腑的功能，所以中医学又称脏腑为“藏象”（图 1 ）。

这种方法以客观见到的现象为依据，建立了认识脏腑的规范和标准，尽管从今天来看这种认识是粗浅的，但是具有一定的客观科学性，这也是该理论沿用至今的原因之一。此外，这种认识方法从人体表现于外的与外界相通应的生理现象为依据，重在对自然变化之“象”与人体生命活体之“象”结合起来认识医学问题，通过逻辑分析与归类，探讨活体状态下脏腑的生理特性，是中医学认识人体生命机制的原创性思维模式。它对过分重视空间结构，精于分解短于整合，精于

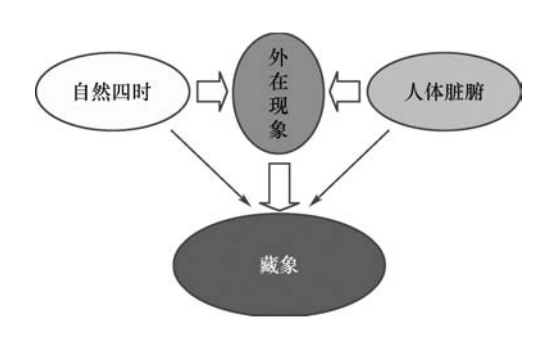


图 1　藏象示意

具体结构短于整体功能，注重体内环境，疏于体外大环境（社会环境、自然季节气候、宇宙星辰等）对人体影响的西方医学体系是一个补充。因此，揭示其独特的科学内涵不仅是中医学发展的需要，也是对立足于解剖结构功能的现代医学研究思路的挑战。

3. 最新进展

“天人相应”整体观是涉及中医理论体系本质的原创性医学理论观点。对其研究远至医圣张仲景的择时用药，针灸中的子午流注学说，近到恽铁樵先生据此提出中医五脏，“非血肉之五藏，乃四时之藏”的观点，历代医家都有研究，主要集中在临床的应用和对文献的阐发。20 世纪 80 年代世界时间生物医学的兴起，以大量的实验与实际调查，证明人体的生理病理变化与自然气候环境的节律性变化相互通应，这个结论与中医学“天人相应”整体观的核心思想十分接近，为中医理论的现代研究架起了一座桥梁，同时也受到了中医界的关注。其中以人体生命节律为依据，探讨“天人相应”整体观在临床发病诊治方面的意义，有大量研究文章发表；当时针对该理论科学内涵进行研究的是北京中医药大学《黄帝内经》专家程士德教授，他在分析研究时间生物医学之后，积极倡导引入现代科学技术和研究方法，创建与“天人相应”整体观研究相关的团队，从《黄帝内经》有关人体五脏与自然四时相应的理论为切入点，从文献整理和实验研究两个方面，开展了大量的理论探索。研究说明中医所论的五脏生理、生化代谢活动与自然四时阴阳消长存在协调共振的规律。经过近 30 年的研究工作，初步认为“天人相应”整体观是中医学依据“时象”（自然界顺应时令季节气候所出现的万物变化现象）观察分析“藏象”（人体表现于外的生理病理现象）的医学理论基础。研究还提出，人体生命除了有以解剖结构为基础的生理组织系统之外，还存在着另一个以微观物质为基础的整体调节生理组织系统。保持这个复杂系统的动态平衡，也是生命生存与延续的基础。

上述研究，符合王永炎院士近年来在中医基础理论研究中所提出的，中医学对人体生命的认识具有“以象为素，内实外虚、动态时空、多维界面”的特征。

它与既有物质基础又能体现生物整体功能表达的生物信息传导系统有着密切的关系。这一研究结果为探讨“天人相应”整体观的科学内涵打下了基础，有很重要的科学意义和价值。

4. 主要难点

一是中医“天人相应”整体观与中国哲学“天人合一”观，在认识论上可以说是一脉相承。由于受本身理论形成时科技因素所限，其理论阐述多采用阴阳五行学说，内容偏于总体现象的理论思辨，缺乏对机制的具体研究，同时因其涉及整体系统的诸多因素，使自己一直徘徊在自然哲学的范围内，哲学的思辨与实证考量之间的矛盾，影响着研究的开展；二是对中医“天人相应”整体观的科学内涵的理解停留在对可见现象的对照性实验，影响研究的升华；三是把中医理论体系的传统思维模式融入实验设计和研究之中，以揭示“天人相应”整体观原创性思维模式的合理内核，其工作十分复杂。

5. 展望

在对事物认识的研究中，恩格斯说：“一切存在的基本形式是空间和时间。”人体也不例外，它也是由空间结构和时间结构两大要素组成的。空间结构指的是形体、器官、组织等，时间结构指的是生命活动的过程、节律和周期等。空间结构反映了机体有形可见的物质结构特点，时间结构则侧重表达生命活动在不断发展过程中“无形”的整体功能状态。可以说时间和空间共同表现着物质的特性，两者的正常有序对于生命的健康有着同等重要的作用。

中医学理论体系侧重于对人体时间结构的认识。西方医学为代表的医学体系主要侧重对人体空间结构的认识，所以中西医所研究的同一个人体，对脏腑功能却会得出两种认识。虽然大家对重视空间结构的西方医学体系容易接受；对注重时间结构，侧重从生命的运动和变化过程中，从生命与外界相关关系中认识脏腑作用和功能的中医学理论，因其短于实证而难于理解。但是中医“天人相应”理论的客观性，给我们展示的是人体生命活动灿烂多姿的另一个方面，即人体生命可能还存在着一个微观生理组织系统，对其物质、生理效能，以及相关规律的解释和揭示，正是本命题科学内涵之所在，可以说是生命科学研究中一个新的领域。

目前自然科学研究技术的发展，比如神经内分泌免疫网络、细胞信号转导系统，以及基因组学、蛋白质组学、代谢组学等研究方法的提出与创建，已经能为研究从微观切入提供科学的手段和方法，前景是美好的。

参考文献

程士德.1992.内经理论体系纲要.北京：人民卫生出版社，101

郭霞珍.2008.对中医学藏象理论研究的思考.北京中医药大学学报，(8)：512～514

郭霞珍,金光亮.1999.脏象理论研究与“时脏相应”说.中国中医基础医学杂志,(12):10～12
郭霞珍,刘晓燕.2005.肾应冬生理机制的研究. 中华中医药杂志:3
郭霞珍,马淑然,刘晓燕.2006.以时测脏理论的分析和探讨.中医杂志,(2):85～87
郭霞珍,张保春.2000.“五脏应时”说的研究与展望.中国医药学报,15(增刊):166～167
罗卫芳,郭霞珍.1999.从松果体与性腺的关系探讨肾“通于冬气”的本质.中国中医基础医学杂志,(8)
叶百宽,郭霞珍,杨美娟.2001.冬夏不同光照下大白鼠松果体细胞结构变化的电镜观察.北京中医药大学学报,24(2):32～34
恽树珏.1990.历代中医珍本集成(二)群经见智录.上海:上海三联书店,43

撰稿人:郭霞珍
北京中医药大学

中医辨证客观化

Objectification of TCM Syndrome Differentiation

“辨证”是中医临床诊断和治疗的核心问题，中医有“方从法出，法随证立”之说，辨证是中医治疗的前提。由于传统中医辨证是建立在整体宏观辨证的基础上，辨证的方法主要靠医者望、闻、问、切得到的信息并加以逻辑推理，与现代医学比较缺少客观的、定量的及标准化的指标，对认识疾病的内在本质有很大的局限性，不利于中医现代化的发展。因此，实现中医辨证的规范化、标准化和客观化就显得非常重要。

然而，如何才能实现中医辨证的客观化？多年来，中西医工作者做了不少有益的研究和探索。大多数研究者认为要实现中医辨证的客观化，其前提是首先要建立统一的中医辨证标准，目前在中医界普遍存在辨证不规范、辨证标准不统一的现象。作为辨证的四诊资料，由于受医者学识、经验、水平的影响，不同医者收集到的四诊资料有不同程度的差异，造成辨证标准不一致，从而影响辨证的准确性。为了实现中医辨证的标准化，中医工作者通过各种专业会议、专家咨询、文献调查、临床调查等多种方式制定辨证标准，不少已形成了共识。但由于传统辨证的四诊资料均是定性的软指标，容易受主观因素的影响。因此在中医传统辨证标准的基础上引入客观化指标，采用宏观和微观相结合的中医辨证方法，将使中医辨证更加科学和客观。

那么如何科学地引入客观指标呢？多年来医学工作者做了不少的尝试和探索。综合国内的研究，主要的思路和研究方法是选择一种疾病，在中医传统辨证分型的基础上，选用能反映该病实质的现代病理生理性微观指标，探讨中医证型与微观指标的关联性和特异性，从而探索与中医证型相匹配的指标。如广州中医药大学脾胃研究所早期在进行脾气证的研究中，根据“脾主运化”的生理病理特点，选择唾液淀粉酶活性、小肠木糖吸收试验、体表胃肠电、胃肠道激素、胃肠黏膜组织形态及黏膜线粒体等指标对脾气证进行多方位探讨，发现脾气虚证与正常人及非脾气证存在不同程度的差异，在研究的指标中发现唾液淀粉酶活性酸刺激前后的比值、小肠木糖吸收试验与脾虚证有较高的相关性，并被国内多家单位反复验证，后在全国会议上定为脾虚证辨证诊断的参考指标。近年来，该研究所又进一步从热休克蛋白、水通道蛋白、唾液淀粉酶糖基链结构、基因表达等进行深入探讨。目前国内在消化系统慢性病、慢性肾炎、冠心病、慢性病毒性肝炎、

糖尿病、高血压等疾病开展了有益的研究。如有研究原发性肾小球疾病载脂蛋白水平与中医辨证分型的关系，发现脾肾气虚、气阴两虚、肝肾阴虚证载脂蛋白 B（ApoB）、载脂蛋白 B/载脂蛋白 A-1（ApoB/ApoA-1）均高于正常值，而以脾肾气虚组升高最为明显，兼有湿证者 ApoB、ApoB/ApoA-1 显著高于不兼湿证者，认为 ApoB 和 ApoB/ApoA-1 可作为脾肾气虚及湿证辨证分型的客观指标。有研究显示，湿热证慢性肾炎患者血清细胞间黏附分子-1（sICAM-1）高于非湿热证患者；慢性肾炎患者气阴两虚、湿热内蕴型尿表皮生长因子（EGF）含量明显高于健康人组，阴阳两虚、瘀血内停组尿 EGF 含量明显低于健康人组。在冠心病中医辨证客观化研究中，研究者从血管活性物质、血流动力学、血液流变性、微循环、血脂、氧自由基、血小板功能等指标探讨中医不同证型的异同，较一致的看法是冠心病气虚型以心功能变化为主；血瘀型以血液流变学和血小板功能变化为主；而气虚血瘀型则兼有以上两种证型的变化。在高血压病中医辨证客观化研究方面，研究者探讨中医证型与肾素-血管紧张素-醛固酮系统、性激素和促性腺激素、血流动力学及寸口脉搏图、血压及动态血压、血液流变学、交感-肾上腺功能、生化指标等不同指标的关系，发现高血压中医不同证型患者许多指标存在差异，如高血压阴虚阳亢型患者卧位和立位的肾素（PRA）均比气阴两虚型患者高，而血管紧张系Ⅰ（ATⅡ）值与 24 小时尿醛固酮（ALD）水平在两型则无显著性差异；高血压阳亢型、阴虚阳亢型及阴阳两虚型均存在性激素水平降低现象。高血压患者心房钠尿肽（ANP）含量低于正常人，其中以肝阳上亢型降低最为明显，阴虚阳亢型次之，阴阳两虚型再次之。关于良性前列腺增生、慢性病毒性肝炎、代谢综合征等病的中医证型与客观指标的关系在国内也进行了大量的研究。特别在慢性肝炎方面，研究者们分别从肝功能、生化指标、病毒复制、免疫指标、病理分级、肝脏影像学等方面探讨中医证型与指标的关系，发现在上述指标中不同中医证型间存在一定程度的相关性，为慢性肝病的中医辨证客观化提供了一定的参考资料。

虽然，研究者在中医辨证客观化研究做了大量的探索，初步反映出中医辨证确有一定的病理、生理基础，但归纳起来看，也仅仅是从某一个侧面或某一个角度，在某种层次上对证的本质进行了一定的揭示，仍未能找到反映某一证型高度关联的、有一定敏感度和特异性的客观指标，特别是能够完全反映不同证型的、重复性好的指标或指标群。在研究思路和方法上，存在中医辨证不统一，研究指标单一，研究工作比较零散，缺少整体性、系统性的研究，研究结果缺少重复性论证。

至目前为止，为何在中医辨证客观化研究中未取得突破性进展，它为何难？难在哪里？首先必须认识到中医的“证”是非常复杂的科学问题，它体现中医在整体和宏观认识疾病的思想，是在整体水平上对疾病发生、发展到某病理阶段的

一个综合性概念，包含疾病的病位、病性、病理与转归等。同种疾病可表现不同的证，不同的疾病可表现相同的证，即“异病同证，同病异证”，可见中医的“证”范围之广，与现代医学从解剖、组织结构、细胞、分子水平认识疾病差距甚远，更主要的是前者为软指标，后者是硬指标。因此，采用现代医学任何单一的或少数微观指标很难或不可能反映证的整体水平，更不说反映证的特异性，即一点何能反映面的道理。

那么如何才能解开这道难题？多数学者认为，中医辨证的客观化研究是系统工程和开拓性工作，不可能一蹴而就，首先研究者要学好中医理论，要充分理解“证”涉及的要素和可能的科学内涵，研究要体现“证”的整体性、动态性特点。主张在有系统的背景下，采用临床与基础、宏观与微观、辨证与辨病、传统与现代研究相结合，综合地、整体地考察研究对象，动态地进行整体性研究，采用包括系统论、控制论、信息论，系统生物学的基因组学、蛋白质组学、代谢组学，以及电子计算机、多元统计等在内的综合性研究理论和方法，从多系统、多层次、多指标进行研究和分析，逐步揭示“证”的内在规律，从而实现中医辨证客观化。

综上所述，要实现中医辨证客观化仍然是一道难题，需要更多热爱中医的科学工作者，特别是有志于中医事业的、勇于创新和开拓的青年投身于这一研究领域，通过脚踏实地、坚持不懈的努力，到达大洋的彼岸。

参考文献

广州中医学院脾胃研究组.1981.脾虚患者唾液淀粉酶活性初步研究.中华消化杂志,(4):212～214

贺泽龙,顾景琰.1990.冠心病中医辨证客观化的研究.中西医结合杂志,10(4):240～241

李常青,王建华.1998.唾液淀粉酶活性比值、D-木糖排泄率和胃电图三者合参对脾气证的研究.湖南中医学院学报,18(2):8～9

李原.2004.中医辨证客观化研究的思路与方法.中国疗养医学,13(1):5

梁兴伦,陆翔.1995.高血压病中医辨证客观化研究.现代中医,28(3):174～177

林琳,盛梅笑.2008.慢性肾炎中医辨证客观化指标研究概况.辽宁中医药大学学报,10(8):77～79

刘波,张亚大.2008.良性前列腺增生中医辨证客观化研究概况.长春中医药大学学报,24(5):567～568

王师菡,王阶,李霁,等.2007.代谢综合征的中医辨证客观化研究.新中医,39(11):14～16

王欣,崔淑玫,马健.2008.慢性乙肝中医辨证分型客观化研究进展.辽宁中医杂志,35(9):1435～1437

杨焕,王东方.2008.变应性鼻炎中医辨证客观化研究.辽宁中医杂志,35(2):313～315

撰稿人：王建华　王汝俊

广州中医药大学

“病”与“证”的辩证统一

The Dialectical Unity of “Disease” in Western Medical and “Syndrome” in TCM

在中西医学理论体系中，西医学中的“病”是现代科学对生命异常现象的把握，中医学的“证”是对人体功能反映失常引起的外在表现的抽象概括。辨证论治是中医的特色与优势，也是中医学的核心命题之一。病证统一是辨证论治的必然要求，是中医现代化研究的重点和关键，也是中医药理论体系和临床工作中面临的一个重要问题。多年来，病证统一的研究取得了不少可喜的成果，但依然存在不少问题。由于辨证与辨病的关系不明确，致使对病症的概念模糊不清，从而影响中医药的临床工作，影响中医药理论的传承与创新。

“病”与“证”的表现上呈现三种情形，有“病”有“证”、有“病”无“证”和有“证”无“病”；认识“病”与“证”的差异及内在规律，对于临床上辨“病”、辨“证”及随“证”施治的有机结合具有重要意义。深入研究病证统一的科学内涵，阐明其内在规律，为“病”、“证”的诊治提供科学理论和系统方法论，将对中医药现代化产生深远影响。

基于生命活动是一个复杂的过程和体系，疾病是多个彼此之间存在相互作用和动态变化的分子引起的基本生理和病理现象，证候是一个非线性复杂系统，方药是治疗病症的主要手段。有学者试图利用系统生物信息理论、现代生物技术，从细胞网络因子等进行“证”的客观化，试图构建“病”、“证”有机结合的“桥”，阐述“方-证-病”的相互关系，其核心思想认为：中医“证”的本质是信号分子的网络紊乱；中药“方”的本质是化学分子（即信号分子）的组合；中药的“方”治疗“病”与“证”的核心机制是“网络对网络”，即中药的信号分子组合对机体细胞因子的组合，不管是单味还是中药复方都是化学分子库，都是通过化学成分组合（信号分子组合）影响机体细胞因子组合，使机体紊乱的信号分子网络恢复平衡，从而达到治疗中医的“证”和相关的“病”。通过选择一定范围的“方”探索已知“病”的“证候”的病机，为研究病与证的辨证关系提供了科学假说的可能。

但由于没有统一、规范的理论体系和标准的共同语言阐述上述网络特点，如何发现这些"网络因子"，特别是如何识别连接病症网络的共同"节点"，将"证"的信息分子组合与"病"建立"关系"，从而揭示证的病因、病机、病位、病势等。基于信号分子、网络因子相互关系的复杂性，这是"病"、"证"统一最主要的难点，也是中医药现代化进程中困惑已久的难题，成为临床疗效评价、方剂朝向证候的整合调节作用等一系列相关问题的瓶颈。

也有学者采用流行病学方法获取"病"、"证"信息，信息融合技术进行病证的辨别与分类，发现了某些病的证候组合规律，推动病证统一研究的发展，但存在着确立证候判定标准困难的问题。

人群中不同疾病或同一种疾病在某一阶段的病理状态通过患者的症状、体征表现出"证"，证的人群网络也可以通过群聚特性进行"证候"分类，寻找同病同证的"节点"，同病异证和同证异病的"连接"，发现"证"的病情发生发展的机制即病机，发现"证"的四诊信息组合与机体的病理生理变化、发生、发展、预后及治疗效应的内在关联和细胞因子的特定组合，形成病证的共同客观指标和动态演变的规律。利用静态特征统计方法进行实证性研究与验证，建立"证"的网络模型，发现病证的共同信号通路，有可能是解决病证统一问题的途径之一。

建立从证候相关生物网络、证候网络关键模块与节点识别、网络动力学分析、方剂对证候网络多靶点调控的"相互作用-网络-功能"的关系网，探索证候及相关病证、方证的内在系统机制，有助于突破单纯实验观测的限制，深入探索中医证的宏观与微观特征。

建立一套完备的医药理论体系，使"病"在精细化、标准化及规范化的基础上进行整体化和差异化，"证"在综合化、动态化的基础上进行客观化和系统化，使机体外在失常表现的"证"与组织器官异常发生的"病"有机结合，有可能是解决"病"、"证"辨证统一的根本途径。

总之，病证统一在当今中医药理论研究中仍处于探索阶段，病、证、方、法的逻辑统一研究才刚刚起步，但这一突出中医思维特征与现代科学融合的研究思路，应该是病证结合统一研究的主要发展方向之一。

参考文献

安德明，郑培永，季光．2009．方证相关在病证结合研究中的意义．中医药学报，37(1)：6～8

方朝义，方芳．2009．从脏腑辨证中"病"的嵌构谈"病与证"的相关性．中医药理论研究，30(12)：52～68

冯文广．2007．科学社会学视野下的中医和西医．成都理工大学学报(社会科学版)，15(2)：1～10

郭蕾，王永炎．2003．关于证候概念的诠释．北京中医药大学学报，26(2)：5～9

郭小青，张长清，韩丽萍．2005．"症"、"证"、"病"等中医诊断基本概念的研究进展．现代中医药，

25(6):57～59
李梢.2007.中医药计算机系统生物学与寒热征候研究. 世界科学技术,9(1):105～111
孙继佳,蒋健,严广乐,等.2008.复杂网络理论及其在中医学研究中的应用.复杂系统与复杂性科学,5(20):55～61

撰稿人:徐志伟　魏小勇
广州中医药大学

分子靶向药物不良反应的中医药防治

TCM for Prevention and Treatment of Adverse Events Associated with Molecularly Targeted Agents

恶性肿瘤严重威胁人类生命健康，已成为目前占第一、二位的死亡原因，且发病率呈逐年上升趋势。进入21世纪以来，以基因、受体、激酶等分子为特定靶点的肿瘤靶向药物逐渐问世，进一步提高了治疗的针对性和特异性。部分难治性晚期肿瘤，经分子靶向治疗后取得成功，如伊马替尼，以Bcr-Abl激酶为靶点，补救性治疗慢性粒细胞白血病，仍可获得完全缓解率40%以上，该药用于治疗高度化放疗抗拒的胃肠间质瘤，可达到80%以上临床获益率。吉非替尼和厄罗替尼，以表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor，EGFR）为靶点，对于EGFR基因突变的非小细胞肺癌，临床获益率可达70%～90%。其他大量的分子靶向药物，如索拉非尼、舒尼替尼、西妥昔单抗、曲妥珠单抗、利妥昔单抗等，已广泛用于临床肺癌、肝癌、肾癌、骨髓瘤、大肠癌、乳腺癌、淋巴瘤、头颈部癌等的治疗。

虽然分子靶向药物的应用前景良好，但却存在不容忽视的不良反应，最常见的是皮肤毒性，包括“手足综合征”和痤疮样皮疹等。“手足综合征”，表现为手足感觉麻木、感觉异常、皮肤色素沉着、肿胀或红斑，脱屑、皲裂、硬结样水疱等，部分患者手足综合征甚至蔓延至全身（图1）。痤疮样皮疹，表现为皮肤干燥、瘙痒、毛囊炎、荨麻疹型药疹、色素沉着、脱发、脓疱型药疹、接触性皮炎等（图2）。消化道反应也较常见，表现为恶心、呕吐、腹泻、口干等。其他比较少见的毒性还有：粒细胞减少、贫血、血小板降低、周围神经麻痹、心律不齐、血压降低、脱发等。

与细胞毒化疗药物的不良反应比较，以上靶向药物的不良反应很少直接威胁患者生命，但会严重影响患者的生活质量，甚至呈现顽固性的特点，有时被迫减量或中断抗肿瘤治疗。对于靶向药物不良反应，当前尚无基于循证医学证实的有效治疗。大多予以一般性对症处理，如对于痤疮样皮疹，应用激素及抗组胺药；对于“手足综合征”，应用维生素B_6治疗等；对消化道反应，采用甲氧氯普胺、洛哌丁胺等治疗。但总体而言，对于严重的或顽固性的不良反应，对症处理疗效欠佳，病情容易反复，甚至产生由激素等次生的不良反应。

而采用中医药防治靶向药物的不良反应，具有重要的科学意义：其一，充分



图1　手足综合征



图2　药物性皮疹

发挥中医药减毒增效的抗癌作用，确保分子靶向治疗顺利实施。这也是中医特色在抗癌领域新的体现。其二，分子靶向治疗和中医药防治肿瘤，都把生活质量作为重要的疗效指标。二者在疗效评价上的一致性，可能促使中西医结合模式的发展。其三，分子靶向治疗，是针对特定基因状态的个体化治疗，与中医辨证论治的个体化治疗思路不谋而合。而靶向药物的不良反应，有研究显示也与个人的遗传变异相关。将靶向治疗的“个体化”与中医药治疗的“个体化”有机结合，促进辨证论治的“微观化”和“客观化”，将不断丰富辨证论治的科学内涵。

中医药防治分子靶向治疗的不良反应，也是目前重要的科学难题。其难点在于：其一，肿瘤分子靶向治疗，主要针对具有基因突变/正常的特殊患者人群。而目前临床基因检测尚未大规模开展，检测方法还有待进一步完善；且由于治疗费用等制约，采用靶向治疗的肿瘤患者相对较少。如何扩大研究样本，以提高证据可靠性？其二，中医药对于靶向治疗药物的毒副作用的认识，古代未有文献记载，如何阐明其病因病机，确定辨证施治原则，需要反复进行临床实践和理论探索，以丰富中医肿瘤学的内涵。其三，如何将分子靶向个体化治疗与中医药辨证论治个体化治疗有机结合，以进一步提高疗效。其四，靶向药物不良反应的分子机制，目前尚未完全证实，这将影响对中医药作用机制的深刻分析。

所幸的是，解决以上难题方面，目前已有一些初步的策略或进展：其一，类似分子靶向药物不良反应的症状描述和辨证治疗，从中医古籍文献《山海经》、《五十二病方》、《诸病源候论》开始即有记载，为靶向药物不良反应的防治提供了理论基础，开拓了临床辨证施治的思路。其二，一些单位和学者，采用中医药防治分子靶向药物的不良反应，并取得了初步的临床成效。如广州中医药大学第一附属医院肿瘤科，对于靶向药物相关性皮疹，提出“肺肾阴虚为其本，卫气营血论其标”的辨证思路，结合内治外洗方法，取得了较好的疗效。其三，针对特定基因突变的分子检测，在个别中医医院得到逐步开展。如广州中医药大学第一

附属医院肿瘤科，已率先在中医药系统进行肺癌突变 EGFR 基因检测，有利于扩大研究中的目标病例数。其四，对于分子靶向药物不良反应的发生机制，最近得到过一些新的阐释。比如，多激酶抑制剂导致的“手足综合征”，可能与血管内皮生卡因子（VEGF）的抑制有关。单核苷酸多态性（SNP）遗传变异，导致 ABCG2 基因活性降低，此与吉非替尼相关腹泻发生的关系密切。以上药物不良反应机制的阐释，有利于揭示中医药对其防治的机制。

分子靶向药物不良反应的中医药防治，意义重大，任务艰巨，需要广大的中医肿瘤学者努力探索。实践中可先易后难，先临床后基础，逐步予以解决。

参考文献

李阳，曾柏荣，刘华．2009．中医药提高晚期癌症患者生存质量的研究进展．中外健康文摘，6(2)：212～215

李亚光，蔡捷，苏承武．2009．中医药在肿瘤治疗中增效减毒作用的研究进展．蛇志，21(3)：209～211

徐丽敏．2008．中医皮肤性病学发展史．中国中西医结合皮肤性病学杂志，7(1)：51～53

薛妍，刘文超．2009．论中医的辨证论治与肿瘤的分子靶向治疗．医学与哲学：临床决策论坛版，30(3)：68～69

余国芳．2009．林丽珠辨治表皮生长因子受体抑制剂相关皮疹的经验探析．世界科学技术-中医药现代化，11(5)：758～763

Azad NS，Aragon-Ching JB，Dahut WL，et al．2009．Hand-foot skin reaction increases with cumulative sorafenib dose and with combination anti-vascular endothelial growth factor therapy．Clin Cancer Res，15(4)：1411～1416

Cusatis G，Gregorc V，Li J，et al．2006．Pharmacogenetics of ABCG2 and adverse reactions to gefitinib．J Natl Cancer Inst，98(23)：1739～1742

Hambley TW，Hait WN．2009．Is anticancer drug development heading in the right direction? Cancer Res，69(4)：1259～1262

Lacouture ME．2006．Mechanisms of cutaneous toxicities to EGFR inhibitors．Nat Rev Cancer，6(10)：803～812

Sharma SV，Settleman J．2007．Oncogene addiction：setting the stage for molecularly targeted cancer therapy．Genes & Dev，21(24)：3214～3231

撰稿人：林丽珠　熊绍权

广州中医药大学第一附属医院

针刺辅助麻醉在全麻手术中的应用研究

The Clinical Application of Acupuncture-Assisted Anesthesia Combining with General Anesthesia During the Surgical Operation

从 20 世纪 60 年代初到 70 年代后期我国麻醉工作者对针刺麻醉进行了长达近 20 年的探索，完成手术 200 余万例，手术种类达 100 多种。然而，事与愿违，无论应用何种穴位组方、刺激方式或参数，虽可在一定程度上提高痛阈，但无论怎样都达不到如药物那样无痛的效果，针刺麻醉始终解决不了“镇痛不全”这一关键问题。针刺麻醉的缺点（镇痛不全、肌松不良和内脏牵拉反应）限制了它的发展，进入 20 世纪 90 年代后针刺麻醉的临床应用呈现萎缩之势。随着生物化学以及分子生物学的迅速发展，许多研究人员通过分子生物学手段，从基因水平并结合药理学、神经生物化学等其他学科，对针刺镇痛机制开展了更加深入的探讨，在针刺镇痛中的神经递质、神经元活动及基因调控等方面取得了很大的成就。通过机制研究，终于弄清了这样一个事实：针刺镇痛作用的存在是有物质基础的，是毋庸置疑的；然而，针刺镇痛的作用是有限的。在人类的中枢神经系统中存在着一个痛觉调制结构，体内还有两种互相对抗的镇痛物质。由于针刺是一种生理性的外因调节，它要借助机体本身的力量来发挥调节作用，而不像药物麻醉可以将生理反应完全阻断。正因为如此，针刺既可以激活体内原有的抗痛结构，又可部分激活对抗镇痛的机制。所以无论在何种情况下，针刺都不允许机体进入无痛状态。也就是说，单纯靠一般的针刺作用是不可能完全解除手术引起的疼痛和疼痛反应的。在这一理论的支持下提出了针刺辅助麻醉的概念，即将药物麻醉与针刺麻醉结合，从而达到减少药物用量及其副作用的目的。针刺辅助麻醉的提出开辟了一个新领域，由针刺麻醉发展到针刺辅助麻醉，形成了“术前诱导-术中麻醉-术后镇痛”的全新模式。

针刺麻醉最大的优势是通过调动机体内在的抗痛机制和其他生理调节作用，无须药物即可起到镇痛、恢复和维持机体的生理稳定的作用，主要包括：镇痛、镇静、减轻恶心呕吐、稳定心脏功能、改善胃肠和膀胱排尿功能等。这些恰恰是当今临床麻醉中尤其是全麻后常常发生又都未能得到很好解决的难题，包括：麻醉前镇静，术中辅助麻醉，术后治疗如减轻伤口疼痛、减少恶心呕吐和促进胃肠功能恢复等。

被现代医学认为具有镇痛作用的药物，在辅助针刺镇痛时可分为三类：一类

为药物作用和针刺镇痛相拮抗，称为针刺麻醉减效药，现已发现有氯胺酮等 6 种；一类是能增强针刺镇痛效果的药物，称为针刺麻醉增效药，已被证实的有芬太尼等 16 种；还有一类对针刺麻醉不产生影响的药物，称为针刺麻醉无影响药，已观察到的有舒必利等 3 种。

针刺与全麻药物联合应用具有协同作用。何威等报道，应用 HANS 仪刺激百会穴，使异丙酚麻醉相应脑区葡萄糖代谢明显下降，提示电刺激百会穴具有加强异丙酚麻醉效应的作用；曲马朵除与中枢阿片受体相结合产生镇痛作用外，还可通过抑制中枢对 5-羟色胺和去甲肾上腺素的再摄取增强针刺麻醉效果。至于针刺产生的镇痛或麻醉效能各家报道不一。王保国等报道开颅手术中复合针刺，可减少恩氟烷用量 45%～48%；张毅等报道心血管手术应用针刺可减少七氟醚最低肺泡有效浓度（MAC）值 17.38%；广州中医药大学第一附属医院在妇科腹腔镜手术中用韩氏针刺麻醉仪行穴位电刺激可减少全麻药七氟醚用量 21%～33%。

虽然广大麻醉工作者对针刺辅助全身麻醉做了大量的探索，初步反映出针刺辅助麻醉有一定的生理基础和临床效果，但研究较深入的多是建立在现代医学主要是生理学基础上的基础研究，相对而言高质量的具有指导意义的临床研究开展得较为滞后，导致目前针刺辅助麻醉远未得到广泛应用。当前面临的主要困难是：①没有建立针刺辅助麻醉的疗效评价体系，针刺辅助麻醉目前多局限在主观指标的观察，可重复性差，缺乏统一协调下的大样本随机对照研究，从而导致对针刺辅助麻醉效果评价的可信度下降；②在不同手术针刺麻醉的具体实施缺乏一个统一的规范，如有效穴位、电针参数的选择，针刺麻醉过程中有效针刺手法的实施、针刺麻醉的规范化操作程序（包括术前诱导、术中操作）等；③麻醉中如何在手术切皮前对针刺镇痛强度进行判断，了解针刺产生了多大的镇痛强度，以决定需要追加多少麻醉药物才能抑制手术伤害刺激引发的不良生理反应，这是麻醉医生最为关注的麻醉问题之一；④对于全身麻醉药与针刺相互作用机制目前尚不清楚；⑤医疗界本身对针刺镇痛这种绿色医疗的重要性未引起足够的重视，同时经济效益相对较低也是造成难以普及的原因之一。

那么如何引入客观的评价体系，将针刺辅助全身麻醉进行规范化，形成一种大家可以接受的容易实施的麻醉方式呢？首先需要多学科进行合作，针刺辅助麻醉研究者应学习好中医理论，尤其是经络学说，运用针刺镇痛基础研究的成果，并与中医理论有机地结合起来指导临床，采用多中心、大样本的随机对照试验进行研究；其次研究者应采用现代化的研究工具对疗效进行评价，如应用麻醉深度监测仪来控制麻醉深度，应用生物化学和分子生物学知识来评价对应激反应及免疫系统的影响；最后在总结既往针刺麻醉临床和实验研究成果的基础上，通过对针刺麻醉操作过程中的各项影响因素综合分析，并进一步规范化、标准化基于不

同手术的针刺辅助麻醉操作方案，对不同的全麻药物进行针药辅助麻醉的研究，以得到客观的试验数据，为临床的应用提供科学依据和规范，从而优选最佳临床针刺辅助麻醉方案。

针刺辅助麻醉具有操作简单、应用方便、费用低廉等优点，这对于降低医疗费用、解决当前存在的“看病贵”问题具有较大的社会意义，同时针对不同的手术制定一种规范化的针刺辅助麻醉方法以指导临床应用，丰富针刺麻醉的现代内涵，对祖国医学走向世界有着重大意义。但是这种规范方法的制定不可能一蹴而就，而是需各级卫生部门的大力的支持和鼓励，甚至某些政策乃至法规方面的倾斜，同时还需要热爱中医的麻醉医生和针灸医生通力合作，在科研机构的统一协调下脚踏实地的开展一些随机、大样本对照、多单位协作的临床研究。

参考文献

蔡雨菲，于建春，韩景献.2009.国外针刺临床研究述评.中医杂志，50(4)：364～366

陈怀龙，王明山，王世端.2006.针刺麻醉的临床应用及前景展望.国际麻醉学与复苏杂志，27(6)：347～350

韩济生.1996.针刺麻醉向何处去？——由针刺麻醉(AA)到针刺辅助麻醉(AAA).中国疼痛医学杂志，2(1)：1

马武华.2008.针刺麻醉的未来.广东医学，29(8)：1254～1255

秦必光，胡北喜，张兰英.2003.中国近10年针刺复合麻醉临床研究概况.针刺研究，28(4)：303～306

王珂，张庆华，赵国屏.2009.针刺镇痛效应个体差异机制研究进展.上海针灸杂志，28(3)：125～127

闫丽萍，马骋，李守栋，等.2004.针刺镇痛临床研究与应用的思考与建议.中国针灸，24(12)：869～871

杨琼卉，马武华，沙雪帆，等.2008.针刺辅助麻醉用于妇科腹腔镜手术的临床研究.广东医学，29(8)：1263～1266

Koo ST，Lim KS，Chung K，et al.2008.Electroacupuncture-induced analgesia in a rat model of ankle sprain pain is mediated by spinal alpha-adrenoceptors.Pain，135(1～2)：11～19

Wang S M，Peloquin C，Kain ZN.2001.The use of auricular acupuncture to reduce preoperative anxiety.Anesth Analg，93(5)：1178～1180

撰稿人：马武华　黎玉辉

广州中医药大学第一附属医院

复杂干预与个体化诊疗的形成、优化和确证

The Formation, Optimization and Confirmation of Complex Intervention and Individualized Medicine

随着人类疾病谱和医学模式的转变，复杂因素疾病逐渐成为医学领域的防治重点。临床实践中，疾病临床情况往往呈现出多因、多果、动态变化等复杂局面，不同患者因人、因时、因地等个体性差异使疾病的复杂性更为突出，因而产生了多角度、多层面、多样化的复杂干预与个体化诊疗问题。医生在实际诊疗过程中常常自觉、不自觉地应用复杂干预，复方治疗与个体化诊疗更是中医独特的临床范式，然而，实际应用中的复杂干预、个体化诊疗是否具有科学合理性？如何形成、优化和确证才符合循证要求？这一问题成为当前医学尤其是中医学、中西医结合领域亟待解决的一个难题。

复杂性科学被誉为是“21世纪的科学”，人体被认为是复杂巨系统，对复杂干预及个体化诊疗等问题采用系统科学的思路和方法开展研究，是复杂性科学在医学领域中应用的具体体现。患者疾病情况的复杂性和医生决策时常规应用复杂干预在临床实践中广泛存在，实现复杂干预的科学性，优化个体化诊疗，减少不必要干预、过度干预、矛盾干预，不仅符合患者的实际需求，同时有助于卫生资源的节约和高效利用。在循证医学和科研方法学领域，群体试验的经典模式在面对复杂干预、个体化诊疗时出现了诸多困惑和挑战，探索有效的设计方案、研究技术，具有很好的方法学价值。复杂干预和个体化诊疗是中医的常规临床范式，中医学有关于复杂干预的阴阳、五行、八纲等理论和系统认识原型，积累了丰富的复方干预、个体化诊疗的实践经验，但与现代科学技术的要求相比，尚存在一定的主观性、模糊性，解决复杂干预与个体化诊疗的难题，将彰显中医学优势，极大推动中医学的传承和创新。

截至目前，虽然复杂干预与个体化诊疗备受各方关注，然而国际上的研究历史较短，进展尚不多，如个体化诊疗的研究更多体现于生物信息学领域的个体差异。总体思路方面，关于复杂干预国际上主要提出了4种模式：MRC（UK）模式、NAFKAM（Norway）模式、整体系统研究、NCCAM（USA）的整体系统模式。其中英国的MRC模型提出了“理论研究、建模、探索性试验、证实性试验、长期应用”的五阶段模型，具有一定的代表性，已被应用于国内外多个研究；有国际工作小组对4种主要模式进行了批判性评价，比较了其一致性与分

歧，并指出对复杂干预需要进一步进行国际研讨、评估复杂干预体系需要新的思路。定性研究方法在复杂干预与个体化诊疗的确立和评价时受到重视，焦点小组访谈、专家共识等在建模阶段时可以使用；一种“常规化程序模型（normalization process model）”被提出，用于复杂干预成为常规医疗措施时的理论评估和解释。对于复杂干预、个体化诊疗的验证与证实，目前国内外主要采用两种思路：一是整体模式，即将其作为一个整体方案看待；一是细化分解模式，即对研究对象及干预进行中医、西医等的充分细化界定。然而考虑到复杂干预、个体化诊疗等的复杂情况，传统群体试验设计的同质性前提、研究效率与效能等受到挑战，循证医学领域也逐渐开始调整，基于实践的“实用型临床试验设计”、“整群随机对照试验”受到重视，同时关注个案、非随机研究等低级别证据及各级证据间的一致性，形成了相关的规范报告格式及系统评价方法。我国开展的专门研究尚不多，973项目“中医辨证论治疗效评价方法研究”主要从疗效评价角度进行了探索。2007年以来特别是2009年之后，疗效比较研究（comparative effectiveness research，CER）成为医疗实践和医学研究的热点，由于疗效比较研究更多地考虑了患者的个体情况、更多关注医生和患者的临床实际需求，其倡导将不同的治疗方法在特定的条件下进行对比，以发现不同疗法针对具有不同特征人群的差别，这恰恰是提供了一条个体化的路径；当然，也引起了方法学领域的争论和挑战，“基于实践的观察性研究设计”、“应用贝叶斯统计分析方法等提高数据分析的效率”、“回顾性二手资料研究的系列方法”等被提出和应用。

复杂干预、个体化诊疗的研究难点主要在于涉及的相关共性与个性要素之间、要素与整体之间的关系模型如何科学地建立、优化和确证。由于相关要素涉及患者特征、干预方法、效应环节等3个不同层面的特征，要素之间的独立性、特异性与非特异性等交叉关系又普遍存在，既往还原论为主的方法难以有效处理这些复杂关系，而要构建一门关于复杂系统的比较正规的理论，有一条路就是求助于层级理论。因此总体上应遵循系统科学指导下的复杂性科学的原则和方法，至少体现在两个方面：一是整体与要素、要素与要素、模块化的理论模型、关系模型的构建原则，如疗效评价方面，总体疗效与环节疗效、阶段疗效与长期结局、个体疗效与群体疗效、特异疗效与非特异疗效等关系模型的处理；二是分析技术方面，单纯统计描述、统计检验、多变量分析等数据分析方法可能有所不足，三维的系统建模、系统仿真、人工智能等技术有望取得显著进展。

从过程角度来看，如何实现复杂干预及个体化诊疗的比较优化是关键环节。由于复杂干预与个体化诊疗需考虑多个要素及其关系、个体性等特点，给试验对照的合理设置、试验的研究效率等带来难度，循证医学单纯的试验与观察模式均存在一定的不适合，一种基于“调查试验互嵌”的结合设计思路，有望保证调查性研究的数据质量，实现试验性研究的共享与可比较、可分析，值得考虑。另

外，基于系统涌现的整体性特点、干预要素等具有不可分割性，软科学领域的整体性复证、三角检验等模式和方法可以借鉴。

参考文献

冯之浚.2003.软科学纲要.北京:生活·读书·新知三联书店,316～326

杨小波.2008.中医学科特殊性与其循证策略的探讨.第五届世界中医药大会论文集(中国澳门),60～63

杨小波,吴大嵘,赖世隆.2006.非随机研究在中医和中西医结合领域中的应用.中国中西医结合杂志,26(1):77～81

Simon HA.2004.人工科学:复杂性面面观.武夷山译.上海:上海科技教育出版社,169～200

Basu A.2009.Individualization at the heart of comparative effectiveness research:the time for i-CER has come.Med Decis Making,29(6):NP9～NP11

Boon H,Macpherson H,Fleishman S,et al.2007.Evaluating complex healthcare systems:a critique of four approaches.Evid Based Complement Alternat Med,4(3):279～285

Campbell M,Fitzpatrick R,Haines A, et al.2000.Framework for design and evaluation of complex interventions to improve health.BMJ,321(7262):694～696

Garber AM,Tunis SR.2009.Does comparative-effectiveness research threaten personalized medicine? N Engl J Med,360(19):1925～1927

Horn SD,Gassaway J.2007.Practice-based evidence study design for comparative effectiveness research.Med Care,45(10 Suppl 2):S50～57

May C.2006.A rational model for assessing and evaluating complex interventions in health care.BMC Health Services Research,6:86

撰稿人：杨小波
广州中医药大学第二附属医院

中医药辅助治疗对放化疗增效减毒的科学基础

The Scientific Basis of TCM Attenuated Synergistic in Treating Cancer with Chemotherapy

20 世纪 90 年代以来，由于放化疗的开展已逐渐完善，恶性肿瘤的治疗取得了很大的进步，但恶性肿瘤的总体疗效仍很局限，而且伴随放化疗所出现的胃肠道反应、骨髓抑制、免疫力低下、耐药等不良反应亦严重影响患者的生活质量。放化疗虽对缩小瘤灶、杀灭肿瘤细胞、防止肿瘤复发具有肯定的作用，但因其非专一、“不分敌我”的作用可破坏患者的免疫系统，损害患者造血系统和肝肾功能，严重者造成患者死亡。而目前已经有越来越多的临床报道和研究发现，在放化疗的同时，辅以中医药治疗有望在增加放化疗疗效的同时减轻相关的毒副反应。

目前认为，中医药能减轻放化疗的毒性和扶助患者正气，不仅能提高疗效、延长生存期，同时对提高患者放化疗过程中的生活质量也会有益。因其减轻了不良反应，也在一定程度上减轻了患者家属及社会的经济负担。

经多年临床研究，发现中药对放化疗的增效减毒作用主要表现在以下几点：①减轻放射性炎症；②减轻血液毒性；③提高机体免疫力；④改善胃肠道功能等。目前认为具有放化疗增效的中药主要有活血化瘀、扶正固本及清热解毒类中药。现代科学实验研究表明：活血化瘀类方药可改善肿瘤细胞的微循环，减少乏氧肿瘤细胞，增强放疗的敏感性；扶正固本类中药能提高血象和增强细胞免疫功能，改善机体免疫状态。大部分患者化疗后疾病进展是由于多药耐药性的出现。有学者发现多种中药单体成分如汉防己碱（TTD）、轮环藤碱（CCN）、蝙蝠葛碱（DRC）和小檗胺（BBM）等可逆转肿瘤多药耐药性。有国内外学者报道，某些中药复方或单味药的有效成分能诱导肿瘤细胞凋亡。

由于中药的成分非常复杂，中药与化疗药物的相互作用也十分复杂，中医药对放化疗减毒增效的作用机制尚未十分明确。而目前中医药减毒增效的作用缺乏来自大样本、多中心、双盲的临床随机对照研究证据，缺乏循证医学证据支持。

随着现代科学技术的发展，特别是基因芯片等技术的兴起，关于中医药对人体的作用机制等方面的研究也越来越多。中医肿瘤学事业尚处于起步阶段，中医药肿瘤事业的振兴仍任重道远，需要更多热爱中医的科学工作者不断努力，整合各种资源，抱着务实的精神，继续验证中医药对放化疗的减毒增效作用及其机

制，揭开中医药神秘的面纱。

参考文献

陈震萍.2003.中药辨治化疗毒副反应体会.现代中西医结合杂志,12(10):1077

范向辉,段玉龙,史中州,等.2006.中药血竭辅助放疗治疗老年食管癌40例.中国中西医结合杂志,26(3):239

高喜源,李俊英.2004.中药对抗放疗毒副作用的临床观察.中华实用中西医杂志,4(17):902～903

金军,孙建.2006.益气养阴法治疗非小细胞肺癌放疗后急性肺损伤24例疗效观察.新中医,37(6):26～27

孔颖泽,孙毅,冷嘉兴,等.2005.贞芪扶正胶囊配合化疗治疗晚期非小细胞肺癌疗效观察.辽宁中医杂志,32(9):872～873

李伟雄,陈应瑞,徐国镇.2002.活血化瘀中药联合放疗治疗鼻咽癌.广东医学,23(1):95～96

肖跃红,郭万周.2004.倍连膏合珍珠散治疗放疗后皮肤并发症27例.山东中医杂志,23(2):86～87

张秋坤,程宏亮.2003.中药治疗放化疗所致白细胞减少症疗效观察.现代中西医结合杂志,13(12):1388～1389

Liu W,Kato M,Akhand AA,et al.1998.The herbal medicine sho-saiko-to inhibits the growth of malignant melanoma cells by up-regulating Fas-mediated apoptosis and arresting cell cycle through downregulation of cyclin dependent kinases.Int J Oncol,12(6):1321～1326

Zheng S,Yang H,Zhang S,et al.1997.Initial study on naturally occurring products from traditional Chinese herbs and vegetables for chemoprevention.J Cell Biochem Suppl,27:106～112

撰稿人：吴万垠
广州中医药大学第二附属医院

人体稳态的辨识和分类

Stable State of Human Body：The Differentiation and Classification

“以平为期”是中医治疗的目的，也是其核心健康观。这其中的“平”是对人体稳态涵义的高度概括。然而，人体稳态不仅仅是停留在概念层面，与西医学的疾病分类不同，人体稳态的认识和辨别是中医学治疗疾病的重要基础，因而有所谓“同病异治”、“异病同治”。中医学认为人体稳态有水平和分类的不同，而这些水平和分类辨识的准确与否往往是临床治疗效果好坏的决定性因素。

人体稳态的内涵在中医古籍书目中早有表述，如“阴阳均平”，“九候若一”，亦有与之相应的“虚则补之，实则泻之”、“微者逆之，甚者从之”的治疗方法。当然，人体稳态观不是中医学独有的理念，1865年法国著名生理学家克劳德·贝尔纳已开始倡导整体生命观，首次提出“内环境”的概念，并认为内环境的稳定是生命存在的必要条件。这与具几千年历史的祖国传统医学强调从整体和系统的角度认识和调节人体生命活动规律不谋而合，美国生理化学家劳伦斯·J.亨德森也于1913年提出具有调节各种生命过程的能力是生命系统的一个重要特征。

卫生部陈竺部长指出中西医学的互通互融是现代医学向更高境界提升和发展的一种必然趋势。对人体稳态相关规律的探索和认识正是这一趋势的具体体现。人体稳态与中医学传统的“证候”内涵接近，不过它在中医学理论和实践的基础上糅合了西医学对疾病的认识、现代生物信息学方法和手段，更具系统性、可认知及可推广性。

近年来有较多学者对人体稳态进行了广泛而深入的研究，包括宏观证候研究、主观报告结局研究以及系统生物学和生物信息学研究等。尽管研究的角度不同，但都是在整合和整体性的基础上，采用多学科交叉的模式，对中医稳态的水平、分类、机制进行探讨，并且取得了重要进展。通过代谢组学的研究发现代谢网络有助于揭示人体稳态的本质，研究人员还发现基于人工神经网络的非线性建模对人体稳态具有较高的诊断和预测能力。依据中医学整体观模型，采用生物信息学方法，对生理状态下五脏系统的动态稳定性、外部随机扰动以及环境中四时因素对五脏影响进行的仿真有助于阐释人体稳态的控制论机制。主观报告结局是近年来关注的命题，认为临床医学应该“以患者为中心”，关注患者的主观感受，而不只是注重生物医学指标的改善。而中医学几千年来一直秉承的也是这个理念，中医学认为患者的主观感受是反映人体稳态的一个重要的、不可忽视的方

面。患者报告结局是主观报告结局研究中的主要研究内容，已被美国国立卫生研究院于 2002 年在 21 世纪医学研究路线图中提出，作为重组临床研究计划的一个重要组成部分。

然而，到目前为止，缺乏对人体稳态的统一认识，亦较少以实证为基础的对辨识方法准确性的研究和探讨，能为临床所用的研究成果并不多见。主要难点在于：①缺乏统一的认识体系。目前的情况多为各层面的研究，如细胞水平、分子水平、动物模型、人工智能及临床结局研究等，均有涉及。然而不同层面研究结果之间的内在联系欠清晰，无法统一到一个体系中加以应用。②概念欠清晰。人体稳态概念有广义和狭义之分，广义上人体稳态包含了生命活动的各个方面，甚至包括一些社会心理指标，如幸福指数等。而医学科学中更多关注的是狭义的人体稳态概念，主要是指机体内部功能活动稳定、协调和有序，且与自然和社会环境相适应的一种生命活动状态。然而，人体稳态在操作层面的内涵，则仍存在一些分歧，尚需不断地加以补充和完善。③不易实现“从临床中来到临床中去”。基础研究必须基于临床实践，临床研究亦不能为了研究而研究，这一点对于中医学尤其重要。既往部分研究，其研究问题往往容易与临床实际脱节，或由于有较多相关的方面和指标，增加了复杂性和成本，使大多数研究结果都不大能直接应用于临床实践。④难以确立标准参照系统。任何一个新体系的产生，都需要对其可靠性、有效性和准确性进行论证，人体稳态辨识和评价体系也不例外。然而这类研究则由于其复杂性和不确定性而难以建立相应的标准系统，这也为研究的开展增加了难度。不过试想一下，如果已经有了这么一个“标准系统”，又哪还需要再去进行研究呢？所以，这也只是一个相对的“标准”，应可以通过分类别、分层次、分角度地设置一些相应的指标来构建。

本着不失中医自身特点的原则，在实证的基础上，广泛吸纳多学科研究成果，从整体生命观的角度，逐步厘清传统信息采集指标与临床效果之间和（或）与微观层面各指标间的关联关系，结合西医学对疾病的认识，系统构建以传统信息采集方法为主，现代方法为辅，能全面反映人体稳态的水平和分类的，并能被广泛认知和推广的相对稳健的辨识和分类体系，是影响该领域中医学学科发展的重大科学难题。坚持以实证为基础的原则，使研究建立在临床实践的基础上，运用现代系统生物学和生物信息学技术，通过辨识和分类体系的研发，使人体稳态借助主观与客观相结合的指标系统性地加以阐释和表达，将为传统中医理论和治疗方法的一些关键问题取得突破性进展，亦使以中、西医为基础的、一个全新的医学科学体系的形成成为可能。

参考文献

白云静，申洪波，孟庆刚，等.2007.基于人工神经网络的中医证候非线性建模研究.中国中医药

信息杂志,14(7):3～4,83

加兰 · E. 艾伦.2000.20世纪的生命科学史. 田洺译.上海:复旦大学出版社,117,123

克劳德 · 贝尔纳.1985.实验医学研究导论.北京:知识出版社,70,89,102,100

庄永龙,李梢,李衍达.2003.基于控制论的中医学四时五脏系统稳态性能仿真.系统仿真学报,15:922～926

Lan K,Jia W.2010.An integrated metabonomics and pharmacokinetics strategy for multi-component drugs evaluation.Current Drug Metabolism,11(1):105～114

Leung KF,Liu FB,Zhao L, et al.2005.Development and validation of the Chinese Quality of Life Instrument.Health Qual Life Outcomes,3:26

Ma T,Tan C,Zhang H,et al.2010.Bridging the gap between traditional Chinese medicine and systems biology:the connection of cold syndrome and NEI network.Molecular BioSystems,oi:10.1039/B914024G

Qiu YP,Cai GX,Su MM,et al.2010.Urinary metabonomic study on colorectal cancer.Journal of Proteome Research,9 (3):1627～1634

Wu DL,Lai SL,Zhou LJ,et al.2009.Further validation of the health scale of traditional Chinese medicine (HSTCM).Chinese Medicine,4:8 doi:10.1186/1749-8546-4-8

撰稿人：吴大嵘
广州中医药大学第二附属医院

治未病的科学内涵及其评价体系的研究

Research Scientific Connotation of Preventive Treatment of Disease and Its Evaluation System

治未病是中医学学术体系及其防治实践的特色，近 20 年逐渐成为临床应用的热点，也是医药保健市场开发的热点。由于该领域的基础研究并未展开，这个概念的内涵、理论基础和实践依据，均有待深入研究，应避免治未病的概念过度外延、扭曲或在市场泛滥的倾向。

治未病包括未病先防与既病防变两重含义。也就是采取一定的措施防止疾病的产生和发展，形成中医学疾病预防和治疗的指导性原则和策略。

“未病先防”与当今预防医学是同义的，但两者的内涵、理论基础、研究方法、目标指向和实践内容并不相同。以现代科学和实验技术为基础的预防医学，对流行病、传染病的研究，既深入又具体，并与卫生学、免疫学等组成庞大的学科体系，是当今世界卫生组织及各国疾控中心所实行的指导方针和技术标准，占尽主流的优势。人们往往由此而将其放在毋庸置疑的位置上，但是，真正的科学，在实践面前是要经受质疑的。例如近十多年来人类相继经历禽流感、SARS、甲型 H1N1 流感的流行，面对这类最古老、最常见的疾病，病毒如何出现、为什么变异、怎样传播和流行、侵袭什么人、为什么有时变得如此凶险、怎样及时预防与治疗等，医学的认识普遍未深入透彻，预防和治疗也很不完善。而每次疾病流行付出的经济代价和社会代价却愈来愈大，这就很值得反思。因为预防医学的目标指向与技术路线，主要是病原体及其所引发的疾病，这些都是已发生和可见的现实，它所追求的永远是物质实体的终极本质和它的固定形态。但是人们真正面对的却是变动中的大千世界，如环境气候、病毒、宿主及传媒、社会人群等，它们之间的变动与相互间的作用，存在太多的未知或不确定因素，其互动结果，可能这样，也可能那样，原来设定的预防的有效性怎能不大打折扣？这就是要研究中医“未病先防”理论的前提。这个理论认识的根源有三点：①中华民族的祖先，从远古开始，近五千年来对大自然的观察，尤其对自身族群生存环境及气候变化有大体正确的认识；②中国古代哲学“天人相应”理论的影响；③长期积累的生活经验和临床体验，总结出人们对环境气候的反应、生活方式及各种治疗方法的效应。所以，中医“未病先防”的研究方法，往往是从气候环境的反常变化，认识正常运行的规律性、周期性和有序性；从人体病态下的异常感

觉和表现，识别生理上如何适应环境，从治疗效应完成无限量的试错实践，从中总结方法，探讨规律。所以治未病理论的实质在于：虽然同样面对环境气候、病邪与人群互动的不确定因素，却将可知可见的一面锁定在人的感觉及医生观测可及的客观表现（证候），设定以人如何适应大自然的变化，调整人们的生存方式为最基本的预防手段；再结合特定人体（个性）体质的寒热虚实，筛选药物或其他方法进行干预，从而获得未病先防、既病防变的效果，这就体现了以人为本的精神实质。这不单是人文科学以人为终极目标的研究，同时亦是在人体上更直接、更真实、更动态的医学实践研究。

"既病防变"在认识上与上述观点一脉相承，但实践的内涵更复杂和丰富。虽然从《黄帝内经》到历代医籍，都不乏以病因、病位与症候群确定具体疾病的概念，如麻疹、癌症、肺痈、肠痈等，到隋《诸病源候论》确定的病种，也不会少于 20 世纪 80 年代东欧医学机构所确定的 691 种疾病。但是与依托现代技术手段分辨疾病的精准程度的西医比较，中医是不能相比的。既病防变理论的特点在于始终视任何疾病为动态变化的过程，其优势长于"辨证"，从辨证掌握发生在具体患者身上的疾病发展规律，从而掌握治疗主动权，这是控制病情发展的治疗学战略思想。"既病防变"的治疗措施，未必以消灭病邪或消除病灶为目的，而是以维护人的生存能力、抗病能力和生存质量，达到尽其天年为终极目标。从汉代张仲景提出"见肝之病，知肝传脾，当先实脾"立论，到清代叶天士做出外感温热病"先安未受邪之地"的论断，都充分地说明了这一点，也是中西医学在认识疾病（诊断与辨证）和治疗措施上最本质的差异。但是要将"既病防变"的观念及由此累积起来的万卷医籍形成的经验与方药加以合理运用，就必须在现实背景下建立一套评价体系，以国家"九五"攻关项目中相关疾病为指南，开展中医、西医对各病种的治疗方略、方法、效果和成本的比较研究，为慢性疑难病优选方案，提供新的思路和方法。

对疑难病建立中西医治疗方案与评价体系是十分繁复而困难的系统工程，但意义重大。正如英国人马丁 • 雅克在《中国文明将覆盖全世界》的文章结论所指出："与西医具有截然不同理论的传统中医将在全球普及。"为什么？答案恰好是中医"以人为本"及西医"以病为本"在治疗方略上的本质差异。开展中医"既病防变"评价体系的研究，是对过去"证候规范"、"证候本质"等项目的后续和应用发展，也是针对着当今医学导向及市场风气的补偏救弊，例如：①认识上主观片面，以西代中，误导舆论。②面对环境气候问题及生活方式的变化，癌症、高血压、糖尿病、抑郁症等成为流行病，人们既有恐惧疾病的心理，又存科技万能的幻想，衍生了夸大或欺骗性的保健品泛滥，误导患者过度检查、过度诊断、过度治疗，形成某些行业垄断、牟取暴利行为，妨碍社会医疗保险事业的健康发展。

参考文献

罗杰·卢因.1990.达尔文医学试图从进化角度解释疾病及其症状.(英)新科学家周刊,10.23
区永欣.1998.中医学术基本原理探讨.广州中医学院学报,(2～3):21～24
全国科学技术名词审定委员会.2004.中医药学名词.北京:科学出版社
王冰(唐).1963.黄帝内经·素问.北京:人民卫生出版社

撰稿人：区永欣
广州中医药大学

中医顺时养生理论的现代认识

Modern Understanding about Health Preserving of TCM Theory in Accordance with the Solar Term

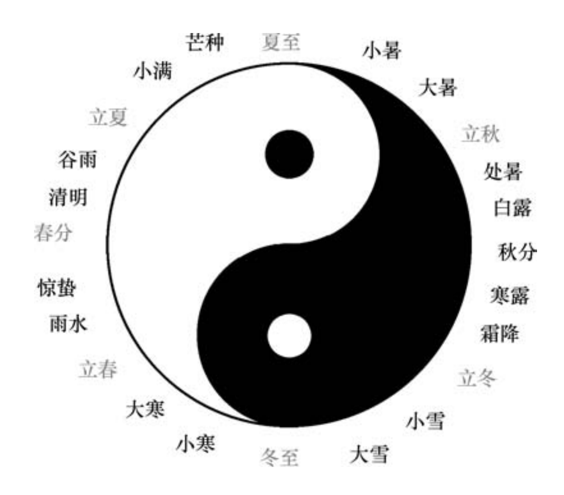
中医养生学是一个以中医基础理论为核心的庞大的养生理论体系，目前中医养生学在临床中面临的难题是现代科学如何更好地认识中医养生理论，更好地用现代语言及已知的科学原理去阐释中医养生理论的精髓。

中国传统医学经过2000多年的积累与沉淀，形成的丰富的养生理论以及基于这种理论所形成的各种有效维护健康的宝贵的养生经验，在现代医学的冲击下，随着西方医疗模式与思维方式的逐渐渗透而被逐渐淡忘与遗失。近几年，随着全民健康需求的提升，中医养生理论又被重新重视，但各种问题也接踵而来，最为突出的就是现代人对养生理论的理解障碍，在中医养生理论的解读与应用过程中存在诸多困难与曲解，很容易出现误入歧途或太过盲目的情况。

在中医养生理论中，“顺时养生”是一个非常重要的组成部分，体现着“天人相应”的最高层次养生理念，从中医学的角度，“顺时养生”有深厚的理论背景，而现代科学或者现代医学尚未对此开展深入研究。因此，随着这种养生观念为越来越多的民众所认可，如何对“顺时养生”理论进行深入的科学阐释，以此进一步科学地指导人们的保健行为，显得越来越重要，有助于提高全民的健康保障意识和能力、减少疾病发生，是逆转目前健康困境、成为“供得起和可持续的医学”的一条重要途径，也是缓和医疗供求矛盾、缓解医疗保障压力的“治本之策”，是解决全球性的医疗危机的可行措施之一，是医学发展、时代发展的需要，更是抢救性地保护和继承中国传统医学精华的重要途径之一。

中医“顺时养生”是“天人相应观”的重要体现。中医学认为人与自然界是一个统一的整体，视天地为大宇宙、人体为小宇宙，大小宇宙息息相通。人们只有顺从它的变化及时地作出适应的调节，才能保持健康。

“顺时养生”的“时”有大小周期之分。从大周期来讲，每年根据当年年运及当时节气（八大节气）进行辨时施养的养生指导（图1）；从小周期来讲，每日根据十二时辰与脏腑运行的对应关系进行辨时施养都是中医养生学的重要理论。如何寻找大小周期中的时间与人体或脏腑的相关性的证据，实现其对临床的指导，是中医养生面临的重要问题（图2）。



1 顺时养生：春夏秋冬、二十四节气的阴阳关系

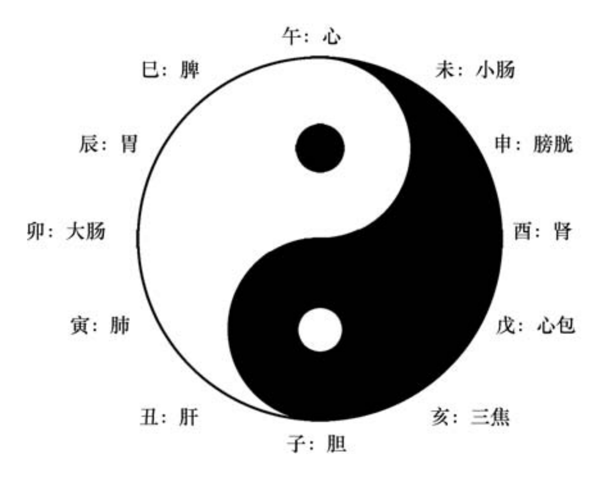


图 2 十二时辰与脏腑养生

大周期中，顺应四时节气养生是最广为人知或接受度最高的中医顺时养生理念。天地四时气候有着春温、夏热、秋凉、冬寒的变化规律，自然界的生物则相应呈现春生、夏长、秋收、冬藏的规律。高明的长寿秘诀是按照天地、日月、星辰的自然运行规律，适应阴阳升降变化，以“春夏养阳，秋冬养阴”的养生方法，达到长寿健康。天灸治疗则是体现“冬病夏治”理念，也即顺应用大周期调治的常用方法，被广为接受，且应用于养生调治领域，大量的研究也显示了有效性。但目前的研究只能证实这种治疗手段的有效性，却并未针对不同时点做对照分析，因此并未能说明治疗时点也即“顺时”所起的作用。

而更大的周期，如五运六气理论，运气属于时空之道，时空之道通贯天道、地道、人道；运气标识时空运变之节律，五运六气标识天地时空运变之节律。而

依据不同年运的养生指导，现代研究很少，究其原因，缘于其理论深奥，研究者不多，应用者更少。

“子午流注”则蕴含着小周期治疗与调节理论。子午流注是中医对时辰节律与人体十二经脉关系的认识，即每日的12个时辰是对应人体十二条经脉的。由于时辰在变，因而不同的经脉在不同的时辰也有兴有衰，环环相扣，十分有序。从字面看，是因“子午”、“流注”而得名。“子”和“午”是十二地支中的第一数和第七数，分别表示两种相反相成、对立统一的范畴或概念，是我国古代用来纪时、标位以及记述事物生长化收藏等运动变化过程或状态的符号。“流”、“注”两字，则表示运动变化的概念。顾名思义，子午流注就是时空和运动的统一，是中国古代天人合一理论在传统生命科学的体现。掌握子午流注的规律，对养生和用药都有很大的益处。

中医“顺时养生”所遵循的其实是“时间节律”，对中医“顺时养生”的现代认识，首先要对“时间节律”进行现代科学阐释，这与现代天文学、宇宙生物学有着密切联系。时间节律实质是星体之间相互运动形成的一种规律。

而不同时间周期内的人体生理功能存在不同的变化规律，这与现代时间生物学是相吻合的。时间生物学（英语：chronobiology；字首来自希腊语 chronos，指时间）也称生物钟学，是研究生物体内与时间有关的周期性现象，或这些现象的时间机制。现代时间生物学认为，生物体及植物体的生命皆随昼夜交替、四时更迭的周期性运动，揭示出生理活动的周期性节律。生物近似时钟的结构被称为“生物钟”。周期节奏近似昼夜（24±4）小时称“日钟”，近似（29.53±5）天称为“月钟”，近似周年（12±2）月称为“年钟”。时间生物学研究揭示了植物、动物乃至人的生命活动具有一个“持久的”、“自己上发条”和“自己调节”的生物钟。比如24小时昼夜的生理节律，这与地球有规律自转所形成的24小时周期是相适应的，生理节律受外环境周期性变化（光照的强弱和气温的高低）的影响而同步。如人体的体温、脉搏、血压、氧耗量、激素的分泌水平，均存在昼夜节律变化，又如细胞分裂、高等动植物组织中多种成分的浓度和活性的24小时周期涨落、光合作用速率变化等。目前的研究显示，对于心血管疾病、肿瘤、支气管哮喘、内分泌疾病如代谢综合征和肥胖等多种疾病的发生，皆与生物钟的紊乱相关。

关于各种周期或时间节律下人体的生理学和分子生物学基础，现代医学研究已经逐步展开，但尚未透彻。而对于违背相关周期规律的情况下，人体可能出现的病理反应，目前研究也较为欠缺。

可以说，现代医学所研究的生物节律“日钟”、“月钟”、“年钟”对应于中医养生概念中的大周期，“时钟”则对应于小周期。但中医的周期非常丰富，比如五运六气的年运周期、12年周期、60年周期、300年周期等，需要解决的难题

不应停留在该周期内人体的生理变化，还应关注到大周期内气象、地球表面运动等各方面的变化对人体可能造成的影响，在此基础上再研究如何在大环境的变化中养生的问题。

目前的难题在于大多数现代科学研究者对中医理论没有深刻的认识，难以挖掘到最深入最精髓的理论内涵开展研究；而中医理论在某些领域中尤其显得深奥艰涩，真正掌握者较少，也是阻碍对这些理论进行研究及应用的重要原因。因此，现代科学与中国传统医学两大阵营的顶尖专家进行合作碰撞并开展的研究，是解决这一科学难题的可取之道。

综上所述，中医“顺时养生”具有极为丰富的理论内涵及现代科学基础，闪烁着古老的智慧光芒，正逐渐为现代医学所认识与认可。对这一科学难题的深入研究与阐释，将为全人类的健康带来重大的积极影响。

参考文献

傅景华.2008.时空之道与五运六气.中国中医基础医学杂志,14(12):881～883

靳九成,金世明,黄建平,等.2008.中医阴阳、五行学说的天文学背景探讨.中华中医药杂志,23(9):757～761

李志更,王欣麒,金香兰,等.2008.“因时制宜”思想的核心价值浅述.北京中医药,27(11):850～852

田合禄,田蔚.2007.中医运气学解密.太原:山西科学技术出版社,2,26,1

朱勉生.2009.子午流注时空结构解析与运用.世界中医药,4(1):43～45

Bittencourt LR,Santos-Silva R,de Mello MT,et al.2010.Chronobiological disorders:current and prevalent conditions.J Occup Rehabil,20(1):21～32

Lik Sprava.2008.Chronotherapy and relativity theory.Polishchuk,(3～4):113～122

Litinski M,Scheer FA,Shea SA.2009.Influence of the circadian system on disease severity.Sleep Med Clin,4(2):143～163

Moser M,Frühwirth M,Penter R,et al.2006.Why life oscillates -from a topographical towards a functional chronobiology.Cancer Causes Control,17(4):591～599

Rana S,Mahmood S.2010.Circadian rhythm and its role in malignancy.J Circadian Rhythms,8:3

撰稿人：杨志敏　老膺荣　林嬿钊

广州中医药大学第二临床医学院

肝硬化的组织学再建与重构及其中药干预作用

Re-constitution and Remodeling in Cirrhotic Liver and Effect of Chinese Medicine

肝硬化属于中医“积证”的范围，是我国常见病和主要死亡病因之一。病毒性肝炎、脂肪肝、酒精肝、自身免疫性肝损害等多种慢性肝病均可殊途同归，通过肝纤维化这一病理过程形成肝硬化，并引起包括肝癌的多种并发症，严重危害患者的生命健康。肝纤维化是肝脏对慢性损伤的病理修复过程，是一动态的组织再建与重构过程。正常肝组织因多种病因遭到破坏、结缔组织增生而形成纤维间隔或假小叶、肝窦毛细血管化或微血管新生等肝组织结构改变。如何防止这种肝组织结构异常改变，以及如何促进已经硬化的肝组织结构恢复？一直是慢性肝脏病治疗的重点与难点。目前，由于抗肝炎病毒、抗炎与抗肝纤维化等药物的成功应用，早中期肝纤维化的逆转已经基本实现，但是对于肝组织结构已经破坏的肝硬化，如何促进肝组织有序地再建与重构，促进肝硬化的逆转，依然是关系诸多慢性肝病患者健康的难题。而历经数千年经验积累的中医药学在慢性肝病的治疗上具有丰富经验，根据这些经验积累，紧密结合与应用现代生命科学技术理论方法，有望为破解这道难题提供探索的路径或对策。

关键病理机制是治疗药物研究的药理基础，需要进一步了解肝硬化肝组织破坏与难以逆转的关键生物学机制。首先广泛肝细胞变性坏死，肝小叶纤维支架塌陷，残存肝细胞形成不规则结节状细胞团；胶原纤维过度沉积与异常分布，形成纤维间隔，包绕再生结节或将残留肝小叶重新分割，纤维组织的沉积受到基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinase，MMP）的调节而降解，使其生成与降解代谢保持平衡，减少瘢痕组织的形成。但为什么肝纤维化后期发生“MMP抵抗”，使得病理沉积的胶原降解不足？MMP活性作用位点需要特定蛋白质序列结构，有研究发现过氧化损伤可使得胶原异常交联，MMP活性位点改变，从而对MMP不敏感，但是否还存在其他重要因素？其次，肝硬化时存在异常明显的血管破坏与改建，包括肝窦毛细血管化与血管吻合支形成，血管新生与肝硬化、肝癌密切相关，加重肝细胞的营养障碍，促进肝硬化病变进一步发展。但是肝硬化时血管新生的分子机制如何，血管新生与肝细胞结节增生之间有无关联？是否与肝硬化向肝癌转变有关，能

否与如何改变异常的肝组织血管结构？最后，在肝组织血管新生及组织再生过程中，肝脏自身干细胞、骨髓间充质干细胞等增生活跃，但是这些干细胞在肝硬化时的归巢与分化特点如何，调控机制如何，与肝硬化结节再生的关系如何？能否通过干预措施，使其向实质肝细胞分化，并促进正常的肝组织结构再生？对这些问题的了解不仅有助于进一步阐明肝硬化的病理机制，而且将为肝硬化的治疗提供药理学基础，即可基于这些关键环节为靶标，进行中药活性成分的筛选。

中医药学治疗类似肝硬化病症的“积证”具有数千年的临床积累，这些经验为我们进行肝硬化的治疗学研究提供了丰富的资源。中医学认为肝硬化是“积证”，“气无形不能结块，结块者必有形之血”。即瘀血为肝硬化之体，而“虚损”乃肝硬化之根。《诸病源候论》明确论述了虚损与癥积之间的病机演化关系，“虚劳之人，阴阳伤损，血气凝涩，不能宣通经络，故积聚于内”。提出癥积总以脏藏虚弱，精髓亏虚为其病机之本，而“血气凝涩”为病机之标。肝硬化“虚损生积”的病机本质是肝脏的形质损伤，阴精亏损，无以化气为用，以致气血不行，络脉瘀阻而成积。但是“虚损生积”的科学内涵是什么、虚与瘀的关系如何、破瘀与补益虚损在肝硬化组织重建过程中的相互关系怎样等科学问题是需要进一步深入阐明的。对于数千年来中医治疗类似肝硬化病症“积证”的经验方既需要规范严格的疗效验证，同时更需要对其中有效方药的规律特征进行系统研究，即这些方剂遣方用药、配伍组合的特点，治疗肝硬化的现代生物学机制如何，能否影响上述的肝硬化三个关键病理环节，这些科学问题的研究与阐明同样将对生物医学发展产生巨大的推动作用。

将中医药的传统积累转变为实践优势，需要结合肝硬化的关键病理生理机制，遵循中医药治疗学的复杂与综合的特征，构建新的研究平台，对有效经验方药进行深度研发。即以肝硬化逆转的关键病理机制为药理基础，构建生物活性评价技术平台，结合植物化学分离分析技术，逐步筛选并发现影响硬化肝组织再生与重构的有效方药活性物质。但是肝硬化病理环节是多方面的，而中药活性也是多种多样。若以针对肝硬化肝脏血管新生这一重要病理过程的研究为例，当围绕其所涉及的多种细胞功能，评价影响不同细胞活性的单一成分，并将这些中药活性成分再整合，优化组分成分配方，进行再验证，从而获得源于传统中医药但疗效优于传统的创新中药（图 1）。根据传统理论经验与现代临床实践，围绕关键病理机制，采用以上方法，多次反复探索，可望为最终发现有效逆转肝硬化的成分复方提供依据，而有效中药的研发将为广大肝硬化患者带来福音。

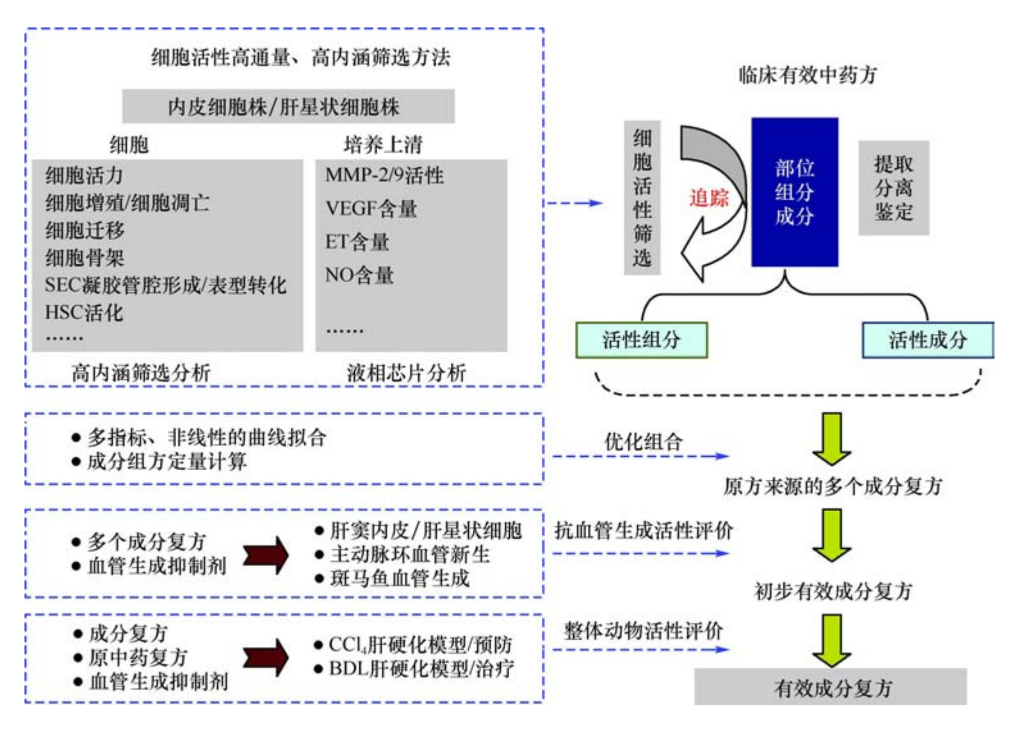


图 1　基于肝脏血管新生的逆转肝硬化中药活性成分及其有效成分复方发现示意

参 考 文 献

谭春雨,刘平.2010.肝硬化“虚损生积”病机理论溯源及现代临床意义.上海中医药大学学报,24(7):25～27

Bataller R,Brenner DA.2005.Liver fibrosis.J Clin Invest,115:209～218

Fernandez M,Semela D,Bruix J,et al.2009.Angiogenesis in liver disease.J Hepatol,50:604～620

Friedman SL.2007.Reversibility of hepatic fibrosis and cirrhosis—is it all hype? Nature Clinic Practice Gastrohep,4(5):236～237

Higashiyama R,Hong YY,Kushida M,et al.2007.Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinase's and contribute to regression of liver fibrosis in mice.Hepatology,45(1):213～222

Liu CH,Hu YY,Xu LM,et al.2009.Effect of Fuzheng Huayu formula and its actions against liver fibrosis.Chinese Medicine,4:12～22

撰稿人:刘　平　刘成海
上海中医药大学

拖线技术治疗难愈性窦瘘的机制

The Mechanism of Thread-Dragging Technology to Treat Refractory Sinus and Fistula

皮肤感染性疾病、糖尿病性坏疽、坏死性筋膜炎、浆细胞性乳腺炎、肛门直肠周围脓肿以及先天性发育异常和相关疾病手术后并发症等，都有窦瘘病灶的存在。窦道是指深部组织通向体表，只有外口而无内口与空腔脏器相通的病理性盲管；瘘管是指空腔器官或体腔与体表间形成的病理性管道。难愈性窦瘘是指病程长（≥3 个月），病位深，管腔多态性，或狭长，或弯曲，或深部膨大成腔，或分支多，或走向复杂，或邻近重要脏器以及骨骼、血管而造成手术扩创有较高难度的病灶。因其病因复杂，长期不愈，几经治疗后又极易复发，严重影响了患者的身心健康及生命质量，不仅从肉体及精神上带来极大的痛苦，同时也加重了社会和家庭的经济负担。因此，难愈性窦瘘创面修复的研究越来越引起外科学界的重视。

难愈性窦瘘的治疗，西医多主张行窦瘘切除缝合术、切开扩创术、抗感染等治疗措施，传统中医治疗多采用药捻疗法、切开疗法、挂线疗法等疗法，但均有不足之处。现行的“拖线技术”是在中医传统药捻疗法与挂线疗法基础上，基于“腐脱新生”的中医疮面修复理论而创立的一种治疗窦瘘的新方法。拖线技术是用银质球头探针导引，将丝线或纱条贯穿于窦瘘病灶中，并掺祛腐药物于其上，通过拖拉，将药物导引至整个窦瘘管腔病灶，促使脓腐液化，保持脓腐畅通流出，达到“脓腐尽，可新生”，从而治疗窦道、瘘管的一种技术。自 20 世纪 80 年代起，拖线技术应用于肛瘘，在取得满意临床疗效后，移用于浆细胞性乳腺炎瘘管、各种先天性窦瘘、手术后形成窦瘘、糖尿病足穿通性窦道、痈疽溃后窦瘘等疾病的治疗，并推广应用于全国多家医院，均取得了显著疗效（表 1）。

表 1　难愈性窦瘘的各种治疗方法比较

疗法	特点
切开疗法	创伤范围广，损伤组织多，病程长；形成瘢痕大；术后功能影响多
扩创引流术	创伤大，创面修复需要一定时间，病程长，对邻近重要脏器、骨骼及肌肉或血管而行手术扩创有高端难度病灶，手术适应证局限，临床疗效不理想
药线疗法	对窦瘘口小者，易致引流不畅；对病位深或走向弯曲的窦瘘，难以插入窦瘘基底部；对外端狭小或内端膨大成腔的窦瘘，药物难以充分附着，均匀分布于整个管腔，不能有效地发挥作用；对分支多的窦瘘，药线难以插入每个分支

续表

疗法	特点
挂线疗法	时间长，延长疗程；造成皮肤缺损；漏治支管、残腔，造成术后复发；需要多次紧线，增加患者痛苦
拖线技术	治愈率高、复发率低、适应范围广、组织损伤小、疮面愈合快、瘢痕小、痛苦少、治愈后功能及外形恢复较好、后遗症少、疗程短、费用低等

难愈性窦瘘属中医“漏”的范畴。中医学认为窦瘘的形成，因局部毒邪未尽，气血运行受阻，致气血凝滞，瘀阻经络，蕴蒸化脓溃破，组织败坏，溃口久不收敛，耗伤气血，不能托毒外出或无力生肌敛疮，脓腐不尽，新肌不生，久而成漏。拖线技术治疗各种窦瘘，能将祛腐生肌药物充分均匀置于管腔内，使药力直达病所；通过拖拉摩擦，全方位刺激窦瘘管壁，疏通经络、活血祛瘀，调整局部功能状态，恢复局部气血正常运行的整体环境，促使毒随脓泄，邪去而正复，既利于脓腐化脱，又有助于新肌生长，从而促进窦瘘创面修复。它无须切开或挂开皮肤、管道或过多切除周围组织，特别是肌肉组织，避免了手术的风险，能最大限度保护窦瘘周围的组织，有效地保护了组织完整性及生理功能（图 1～6）。

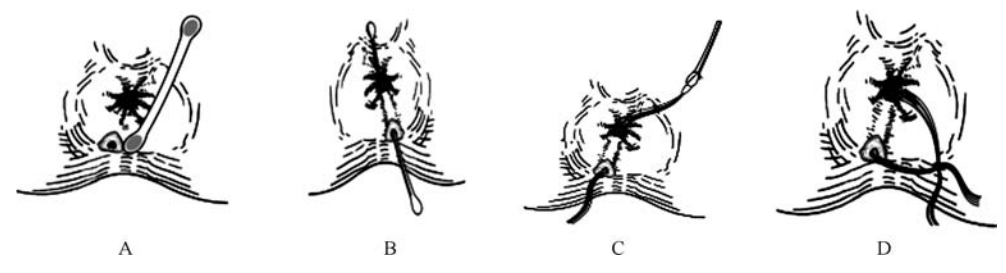


图 1　拖线技术操作示意

A．搔刮瘘道；B．探针探查；C．丝线引入瘘道；D．丝线打结成线环







图 2　糖尿病足拖线治疗

A．术前；B．拖线治疗；C．创面愈合





图 3　复杂性肛瘘拖线治疗

A. 拖线治疗；B. 创面愈合





图 4　浆细胞性乳腺炎拖线治疗

A. 拖线治疗；B. 创面愈合







图 5　背部痈（48cm×40cm）拖线治疗

A. 术前；B. 拖线治疗；C. 创面愈合

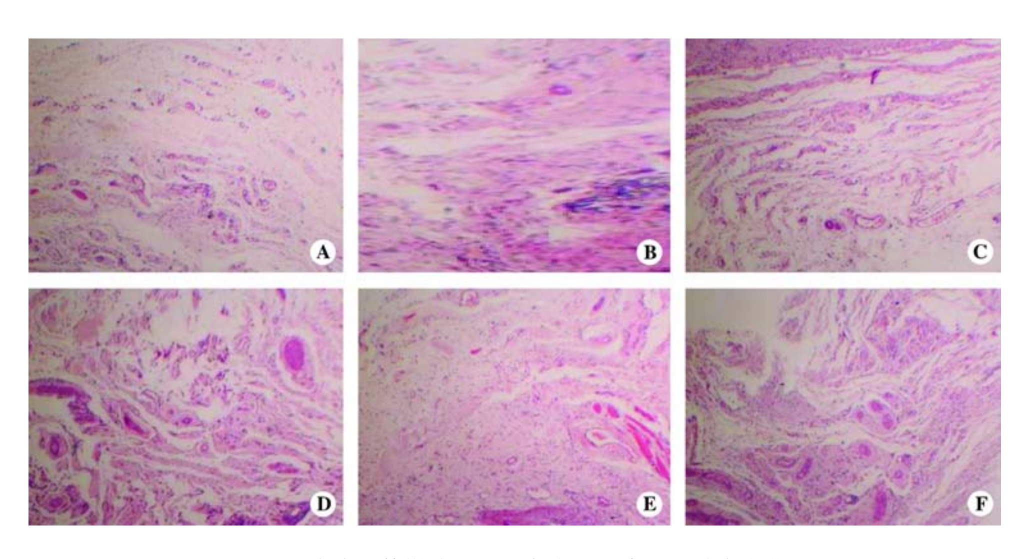


图 6　拖线最佳撤除时间研究中组织病理学动态变化
A. 5 天淋巴细胞浸润，少量新生血管；B. 7 天淋巴细胞浸润，炎症细胞明显；C. 9 天少量成纤维细胞伴血管新生；D. 11 天成纤维细胞增多，炎症细胞较少；E. 13 天成纤维细胞增多，血管增生；F. 15 天成纤维细胞较多，血管增生明显

2009 年首次建立大鼠体表瘘管模型，观察了拖线技术促进大鼠体表瘘管创面愈合的疗效及对局部组织生长因子、胶原、微血管数目等指标的影响。结果提示拖线技术加速体表瘘管创面修复愈合的机制在于调控窦瘘创面修复过程中内源性碱性成纤维细胞生长因子的水平以及Ⅰ型/Ⅲ型胶原的含量及其比值，诱导血管新生；并通过动态观察体表瘘管局部分泌物性状，瘘管愈合过程中造模后 5、7、9、11、13、15 天局部组织的表皮生长因子、转化生长因子、Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原、成纤维细胞数量等指标以及组织病理学的动态变化，论证了拖线最佳撤除时间在第 9～11 天。这些研究为拖线技术的临床疗效及拖线最佳撤除时间的选择提供了实验依据，部分阐明了拖线技术促进窦瘘创面修复的作用机制。同时国内许多学者开展了中医药促进创面修复的机制研究，对进一步明晰“拖线技术”的作用机制提供了新的佐证。一些研究发现“腐去肌生”是皮肤溃疡的愈合规律之一，“祛腐生肌”法中药能通过促进表皮细胞的增生、分化，提高肉芽组织的 DNA 含量及改善创面的血液循环，提高创面脓液中溶菌酶、氨基酸的含量，促使创面 pH 变化进程加快等，可使坏死组织较早脱落，肉芽组织提早出现，创面愈合时间缩短。而另外一些研究结果提示益气化瘀生肌中药能促进创面的渗出，并通过增强创面的抗感染能力；调控生长因子的合成和分泌；促进成纤维细胞分裂增殖；调控创面修复过程中缺氧诱导因子、血管内皮细胞生长因子等，改善创面的缺血缺氧状态，诱导创面新生血管形成，促进创面血管再生，改善微循环；

调控胶原的合成及代谢；调控创面修复过程中转化生长因子及 Smad3、Smad4 参与的信号转导通路；调节创面修复基质形成；营养创面等多途径、多靶点、多环节的综合调控作用，从而提高机体本身修复能力，并创造一种既利于修复，同时又不破坏正常组织修复进程的生理环境，促进创面修复，有效地预防或减少瘢痕形成，提高愈合质量。

由于创面修复通过局部组织再生（regeneration）、修复（repair）、重建（reconstruction），进行修补的一系列病理生理过程，是炎性细胞、表皮细胞、内皮细胞和成纤维细胞及多种生长因子共同参与的生物化学和细胞学、免疫学、分子生物学构成的复杂的生物学过程。拖线技术作为治疗窦瘘的一种新方法，其促进创面修复的机制研究尚需进一步深化。例如，①拖线技术干预的关键环节、适宜时机、适宜人群；②拖线技术的“线”的材料对创面修复的影响；③拖线的机械刺激与黏附少量丹药在创面修复的相互影响等。这些关键技术的解决，对阐明拖线技术科学内涵，进一步提高临床疗效起到关键的指导作用，丰富和深化中医药促进创面修复的研究。

参考文献

陈红风，唐汉钧，陆德铭．2004．中医药治疗浆细胞性乳腺炎四十五年回顾．上海中医药大学学报，18(1)：60～61

李竞．1995．中西医结合疡科进展．中国中西医结合外科杂志，1(3)：53～55

陆金根，曹永清，何春梅，等．2006．隧道式拖线术治疗单纯性肛瘘的临床研究．中西医结合学报，4(2)：140～146

阙华发，唐汉钧，王林扬，等．2005．益气化瘀法促进慢性难愈性创面修复愈合的机制研究．中西医结合学报，3(3)：243～247

王琛，陆金根，曹永清，等．2009．隧道式拖线术对瘘管大鼠胶原表达的影响．中国中西医结合外科杂志，15(4)：428～438

肖慧荣，万顺兰，徐玲．2003．切开挂线对口拖线引流术治疗高位复杂性肛瘘疗效分析．江西中医药，12(34)：23

撰稿人：陆金根　阙华发　郭修田

上海中医药大学附属龙华医院

中医药预防、阻止和逆转心室重塑

The Treatment of TCM in Preventing and
Reversing Ventricular Remodeling

心力衰竭是由于心脏结构或功能性疾病导致心室充盈和射血能力受损而引起的一组临床综合征。由于冠心病、高血压、肺部疾病等导致慢性心功能不全的主要疾病发病率不断上升及社会人口老龄化的到来，心力衰竭已成为21世纪最重要的心脏疾病，成为心脏疾病治疗的最后关键问题。我国社会老龄化已接近西方国家水平，且近年心血管疾病诊疗条件的改善和新技术的广泛应用，心脏病患者生存年限延长等，均导致我国心力衰竭患病率迅速上升。2003年公布的流行病学资料表明我国心力衰竭的平均患病率为0.9%（35～74岁），在45～54岁人群为1.0%，55～74岁人群为1.3%，且未来10年将成倍增加。20世纪末的10余年中，尽管心力衰竭的治疗决策发生了重大改变，药物治疗也有了长足的进步，但是心力衰竭死亡人数仍然一直在不断增加；心力衰竭已成为日益严重的全球性公共卫生学问题。

慢性心力衰竭（CHF）发生发展的基本机制是心室重构，心室重构是由于一系列复杂的分子和细胞机制导致心肌结构、功能和表型的变化。这些变化包括：心肌细胞肥大、凋亡、胚胎基因蛋白质再表达、心肌细胞外基质量和组成的变化。临床表现为心肌质量、心室容量的增加和心室形状的改变。基于CHF机制的更新，心力衰竭的治疗决策发生了革命性的改变，从短期的、血流动力学/药理学措施转变为长期的、修复性策略，修复衰竭心肌的生物学性质，阻断神经内分泌、细胞因子的激活和心肌重塑之间的恶性循环已成为心力衰竭治疗的关键。2001年和2005年美国AHA/ACC心力衰竭指南根据心力衰竭发生发展的过程，从心力衰竭的高危人群直至难治性心力衰竭，分成A、B、C、D四个阶段，提供了从防到治的全面概念，以及不同阶段的治疗对策。但是，面对心力衰竭日益升高的发病率、持续不降的高死亡风险和难以逆转的恶性病程，其治疗仍然是一种持续性的挑战。大量临床循证研究及动物实验已证实神经内分泌抑制剂治疗可延缓或逆转心肌重构。但这些药物的临床应用也存在诸多问题，如β-受体阻滞剂不能应用于血流动力学不稳定或伴缓慢性心律失常的患者，晚近循证研究（BEST试验、MOXCON试验）发现，在较重的心力衰竭患者，使血去甲肾上腺素水平大幅度降低反而增加死亡率，尤其对大多数NYHA Ⅳ级需要肾上腺素

能支持者，可能起有害作用；CHF 患者常伴有肾功能不全导致 ACEI、ARB 等用药受限，在原来有效的神经内分泌抑制基础上，加用药物进一步降低死亡率、病残率的作用已经愈来愈有限。此后发展起来的非药物治疗并未能为大多数心力衰竭患者带来益处，因心脏再同步化治疗（CRT）并不是针对所有心力衰竭人群的治疗，目前仅对那些心室收缩明显失同步化的人群有用；而干细胞治疗对改善左室射血分数和促血管生成可能有所益处，但使心肌细胞再生的可能性较小，而心肌细胞丧失是心力衰竭的根本原因；至于心脏移植确实延长了部分终末期心力衰竭患者的生命，但是缺少供体、长期排异和高昂的费用等，难以在临床广泛应用。人们希望有同时能改善症状及预后，又减少负面影响的新型药物或治疗手段。而现状是心力衰竭的药物治疗发展已进入了一个平台期，非药物治疗则由于技术、费用、伦理、适应证局限等问题难以广泛造福于心力衰竭患者。现阶段如何进一步改善心力衰竭预后确是一个非常具有挑战性的难题。

中医学并无心力衰竭病名，关于该病病机描述只散见于相关证候的描述中，并无确切和完整的论述，心力衰竭的各种临床表现可归属于中医学“喘证”、“心悸”、“怔忡”、“心水”、“水肿”等范畴。中医理论认为，在心力衰竭的发病中，心气虚是病理基础，心阳虚是疾病发展的标志，心肾阳虚则是疾病的重笃阶段，而瘀、水内停是病程中的必然病理产物。气虚阳衰、瘀血与水停三者是密不可分的。瘀从气虚来，水由阳虚生；血瘀气愈虚，水泛阳更损，这在心力衰竭的病机发展过程中形成了恶性循环。

慢性心力衰竭防治的难点是：如何预防、阻止和逆转心室重塑。

目前中医药对心室重构的研究仅处于初始阶段，对相关中医理论的探讨，临床报道甚少。《丹溪心法·痰》云：“凡人身上中下有块者，多是痰。”《医林绳墨·痰》曰：“痰者……在心经者……其痰坚而成块。”是对心肌纤维化的描述。李氏运用“痰瘀互结”理论解释心室重构，提出“痰瘀互结，痰凝于心则使心肌肥大，认为心室重构是以心气虚为本，痰滞血瘀为标”。对 CHF 患者进行规范化分型，其中心阳虚血瘀证，见有发绀、肝脾大，这可能是心功能由代偿期进入失代偿期的重要时期，与心脏重塑、心肌细胞肥大、细胞凋亡等多种因素交互影响有关。张氏将 CHF 早、中、晚三期与中医辨证分型相结合，认为晚期以心肾阳虚、阳气虚脱、血瘀痰凝水泛为主，存在心肌细胞凋亡、心室重构的改变。蔡氏从“心肾相关”理论，提出以补肾法为主治疗 CHF 的观点，拟定具有调补阴阳、温肾益心、化瘀平喘之功效的“补肾复元方”。通过分子细胞水平研究发现：补肾复元方逆转左室重构的作用可能是通过纠正循环内分泌和局部内分泌的紊乱，尤其是通过降低左室局部心肌组织的血管紧张素Ⅱ水平来干预的。通过中医类比推理的思维方法，刘氏认为：水、饮、痰、瘀互结于心则使心肌细胞肿胀、肥大，进而心肌纤维化，发生心室重构。刘氏以 CHF 心室重构的发生主要以心

肾气阳两虚为本，水饮痰瘀为标，是本虚标实的具体表现为理论依据，运用温阳益气，活血化瘀利水为法则的强心合剂，阻止或延缓心室重构的形成。

根据中医整体观学说，作为心功能不全的一种代偿方式，心室重构过程必然受到心肾阳虚的作用。因此，心肾阳虚是造成心室重构的根本原因。心功能不全的基本病理变化为本虚标实，心室重构则是“标实”的具体表现。从中医理论角度来讲，心室重构与心力衰竭的病机有相同点，都有本虚标实的特点，但是心室重构则更重视标实的重要性。

目前，中医认识心室重构，多集中于以心室重构指标作为中医药抗心力衰竭疗效观察指标。但中医药学的精华在于辨证论治，讲究理法方药的环环相扣。通过对抗心室重构有效方药的反推，可以从临床实际出发，认识心室重构的中医机制。

对心肌梗死患者加用通心络治疗，证明其可在一定程度上干预心室重构。通心络依据中医络病理论研制，具有益气活血、祛瘀通络的功能。益气药具有健脾生肌、活血药具有祛瘀生新的作用，可通过增加坏死心肌的吸收、减少瘢痕形成、抗血小板聚集、增加纤溶活性、扩张血管、增加心肌血流灌注等作用，抑制急性心肌梗死后心室重构的发生与发展。可见气虚、血瘀证的存在是心室重构的一个可能机制。另一篇对心肌梗死后心室重构研究的文章是以人参、麦冬与川芎嗪联合使用为干预措施的，同样具有益气活血的功效。通过对其他益气活血化瘀方剂的临床与实验研究，也说明了益气活血法在抗心室重构中的地位。夏氏通过对益气活血法在 CHF 中的应用进行综述，认为益气活血类方药可以有效改善心功能，改善血液流变学指标，抑制心力衰竭左室重构和心肌细胞凋亡，延缓心力衰竭发展，对心力衰竭左室重构有一定的干预作用。韩氏对益气活血法治疗心肌梗死后心室重构表达了同样的看法。而一篇针对益气活血中药对心肌梗死后心室重构影响的 Meta 分析表明，临床可选用益气活血中药以减轻心肌梗死后的心室重构。可见益气活血法或益气活血方药在现代中医心室重构治疗中占据了主要的地位，同理表明气虚血瘀证是心室重构的主要证型。

以上治法对应的病机与目前中医界对心衰心室重构的认识基本相同。虽然益气活血法目前已成为治疗心室重构的主要治法，但是其他治法如养阴、温阳等治法及单独使用化瘀、益气法也不可忽略。尽管各种治法从现代医学疾病学角度来看有较明显的聚集倾向，如针对心肌梗死后心室重构，使用益气活血法较集中，而心力衰竭心室重构则温阳活血相对较多。但从中医角度来讲，以益气活血为主要治法，根据患者辨证结果，兼顾温阳、养阴、涤痰，乃至八法，则更具临床实用性。

目前，中医药治疗心力衰竭多在出现悸、喘、肿后才进行干预，而当今医学界提出的“提前治疗未出现明显充血性症状的患者”这一观点与中医学理论“治

未病”思路不谋而合。“不治已病治未病”是早在《黄帝内经》中就提出的防病养生思想，它包括未病先防，调养结合；欲病救萌，预防为主；已病早治，防其进展；既病防变，防其复发；病缓未愈，防其恶变等多个方面的内容。对可能引起心力衰竭的各种危险因素、不良行为进行纠正、调养，而对于冠心病、高血压、糖尿病等偏颇体质未发心力衰竭者，积极采取相应的养生保健措施，改善特殊体质，增强自身的抵抗能力，对CHF的预防起到事半功倍的效果。

20世纪后叶以来，中医界和中西医结合医师在中医药防治心力衰竭方面已经完成了大量的研究，从不同的角度和层面证实中医药治疗心力衰竭的有效性，并对其作用机制做了不同程度的探讨。由于中医药注重整体调治，可实现充分的个体化治疗，并可从多靶点干预心力衰竭的病理机制，从而延缓心力衰竭发生和进展；并由于中药的不良反应少，适于长期使用，因而在心力衰竭防治方面显示了良好的前景。应将防治心室重塑的理念前移到CHF的各种原发病的治疗中，通过中医辨证和辨病相合，总结疗效，经药物筛选和中药药理、毒理研究，找出阻止和逆转心室重塑的有效方剂、中药和有效组分，可能是一种可行的思路，应是一种复杂性干预。

参考文献

陈伟，顾仁樾，朱平，等.2002.通心络调控心衰大鼠β受体系统抑制心室重构的实验研究. 中国中医药科技，9(5)

陈伟，孙鑫，王文健，等.2008.通心络干预心肌梗死后心室重构的临床多中心研究.中华医学杂志，88(32)

郭兰忠，刘中勇.2000.新编中医内科临床手册.南昌：江西科学技术出版社，183～188

胡大一，吴彦.2003.心力衰竭的现代治疗.天津：天津科学技术出版社

李玉梅，江水印，卫洪昌，等.2006.病证结合的充血性心力衰竭的基本证型演变规律的研究进展.中西医结合心脑血管病杂志，4(7)

马金，张艳，礼海，等.2009.从中医治未病思想谈慢性心衰的三级预防.世界中西医结合杂志，4(10)

撰稿人：严世芸
上海中医药大学

筋在骨与关节退变性疾病中的作用

The Role of “Jin” in the Degenerative Diseases of Bone and Joint

在全球范围内，骨质疏松症、骨关节炎、类风湿关节炎、脊椎病、骨折等骨科疾病影响着千百万人的生活，这其中又以骨与关节退变性疾病最为常见。作为这类疾病主要病种之一的骨关节炎（osteoarthritis，OA）仅在中国60岁以上的人群中患病率便可达50%，75岁以上的人群中则达80%，且致残率高达53%。骨与关节退变性疾病现已成为当代骨科面临的重要医学问题。

OA相关研究已取得了很大的进展和丰硕的成果。但OA的发病及其病理过程的分子机制现仍不清楚，这阻碍了对其进行确切有效的治疗和进行相关药物开发。尽管多数学者认为OA可累及可动关节的全部组织，但现有基础研究仍然集中在骨或软骨的层面展开。例如，最近研究认为Wnt-β-catenin信号通路可能是OA软骨破坏病程中最重要的分子信号通路，但仍不能说明骨关节炎发病的确切机制。骨科杂志《JBMR》为此专门做了评述，并且指出这种机制上的不确定性直接导致了OA缺少特异性的治疗药物。此外，对于如软组织等其他组织与OA关系的研究，仍鲜有涉及。为数不多的一些研究已证实软组织在OA发生发展过程中的作用。例如，骨骼肌质量在30岁以后平均每10年下降6%，且膝关节OA患者的肌力明显低于正常人。膝关节周围骨骼肌质量的减少必然导致肌力及膝关节稳定性的下降，进而引起膝关节OA的发生。另外，多数OA患者的前交叉韧带中Ⅲ型胶原明显增多弥漫但形态紊乱、Ⅰ型胶原含量减少，这种类似于反复损伤的组织表现使韧带变得脆弱、膝关节稳定性的下降，加速OA的发展。但由于软组织涵盖范围广，本身又是一种柔软体，软硬度不一而多变，是具有较大变形、变截面、不匀质、黏弹性、黏塑性、非完全性的弹性体，其全身分布不匀而又重叠、长短不一、神经支配重复、血管分配复杂、炎性反应不一，尚有许多生理病理、生化因素指标不明确。影像学的磁共振虽然能在一定程度上客观揭示软组织的表现，但其功能行为研究尚相对缺少可供观测的现代科技手段。这些都带来了对进一步深入研究软组织在OA中作用的困难。

在后基因组时代，“一个基因对应一个疾病”已成为过去时的大背景下，中医学通过“整体观念”、“辨证论治”、“阴阳和合”等诊疗理念来诊治疾病的优势正逐步得以体现。在中医学中，对于骨与关节退变性疾病的治疗多从“肝主筋”（或又佐“肾主骨”）以论治。并通过随机双盲对照研究显示“柔肝养筋”中药治

疗膝关节 OA 能有效缓解患者症状；从针灸及手法的治疗角度看，其实际作用层面也多从“筋”的角度切入。而针灸治疗膝关节 OA 也已被国际认可，Ezzo 的系统回顾肯定了针灸治疗 OA 疼痛的作用，国际骨关节炎学会 2008 年发布的膝骨关节炎诊疗指南的专家共识中也认为针灸和手法可以改善 OA 疼痛症状。中医学认为“筋”的概念一般相当于软组织的层面。其涵盖了解剖学所称的肌肉（功能）、肌腱、韧带、筋膜等组织器官，并将其作为一个整体来考虑。而“筋”的作用在《黄帝内经》中如是论述：“诸筋者，皆属于节”、“宗筋主束骨而利机关也”，这说明古代医家已经认识到“筋”与关节功能结构的相关性，并对“筋”在功能方面的表达尤为侧重。其又说：“膝为筋之府”、“肝主筋”、“肝主身之筋膜”、“七八肝气衰，筋不能动，天癸竭，精少，肾脏衰，形体皆极，肝肾不足则筋骨不利”，用中医学的观点阐明了膝关节为什么是 OA 最常侵袭的部位。由此可见“筋”在骨与关节退变性疾病中的地位与作用。因此，中医学认为 OA 这类疾病究其根本是一个“从筋到骨”的病理发展过程。而“筋”在骨与关节退变性疾病中的病理机制如何，着眼于“筋”的治疗如何影响到骨是很有待研究的医学问题，并能以另一个角度来分析研究 OA。

基于上述理论与临床研究的结果，根据中医的“整体观念”、“阴阳和合”的诊疗原则，可通过对中医治疗 OA 的有效方法中探寻其治疗靶点，采用基因组学、蛋白质组学、代谢组学等研究方法有可能将与 OA 相关的基因、蛋白质、细胞因子、信号通路等一一找出。并在此基础上，于“筋”等相关组织中寻找特异性、关键性的靶点，既有利于深化 OA 的基础研究，也有利于揭示中医药治疗 OA 的作用机制，甚至有可能在 OA 的防治上取得突破性的进展。

参考文献

薛静，刘玉杰，眭祥，等.2006.膝骨关节炎前交叉韧带Ⅰ型和Ⅲ型胶原纤维定量分析及组织学相关研究.中华老年多器官疾病杂志，5(4)：283～287

中华医学会骨科学分会.2007.OA 诊治指南(2007 年版).中华关节外科杂志，1(4)：281～285

Cao YL，Shi YY，Zheng YX，et al.2005.Blood-nourishing and hard-softening capsule costs less in the management of osteoarthritic knee pain：a randomized controlled trial.Evidence-based Complementary and Alternative Medicine，2(3)：363～368

Ezzo J，Hadhazy V，Birch S，et al.2001.Acupuncture for osteoarthritis of the knee：a systematic review. Arthritis Rheum，44(4)：819～825

Fielding RA，Meydani M.1997.Exercise，free radical generation，and aging.Aging (Milano)，9(1～2)：12～18

Hurley M V.2003.Muscle dysfunction and effective rehabilitation of knee osteoarthritis：what we know and what we need to find out.Arthritis Rheum，49(3)：444～452

Kawaguchi H.2009.Regulation of osteoarthritis development by Wnt-beta-catenin signaling

through the endochondral ossification process .J Bone Miner Res ,24(1):8～11

Kuettner KE ,Goldberg VM .1995 .Osteoarthritic disorders .Rosemont ,Ⅲ .American Academy of Orthopaedic Surgeons ,357～363

Zhang W ,Moskowitz RW ,Nuki G ,et al .2008 .OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis ,part Ⅱ :OARSI evidence-based ,expert consensus guidelines .Osteoarthritis Cartilage ,16(2):137～162

Zhu M ,Tang D ,Wu Q ,et al .2009 .Activation of beta-catenin signaling in articular chondrocytes leads to osteoarthritis-like phenotype in adult beta-catenin conditional activation mice .J Bone Miner Res ,24(1):12～21

撰稿人：石印玉　曹月龙　高宁阳
上海中医药大学附属曙光医院

萎缩性胃炎癌前病变与中医药治疗

The Precancerous Lesion of Atrophic Gastroitis Treated with TCM

慢性萎缩性胃炎（chronic atrophic gastritis，CAG）是一种消化系统常见病、多发病，在慢性胃炎中占10%～30%，病理特征以胃黏膜上皮和腺体萎缩、黏膜变薄、黏膜肌层增厚及伴有肠腺化生（intestinal metaplasia，IM）、异型增生（dysplasia，DYS）为主。胃癌前病变（precancerous lesion of gastric cancer，PLGC）是指萎缩性胃炎伴不完全型肠上皮化生和（或）中重度不典型增生，这是在1998年Houston和Padova两次国际会议以后，消化病学和病理学专家对胃癌前病变的定义和界定范围取得的一致意见。

慢性萎缩性胃炎癌前病变的癌变风险问题引起广泛关注。国内一项随访11年的调查研究表明，慢性萎缩性胃炎（233例）、胃黏膜肠化生（196例）、胃黏膜异型增生（42例）的癌变率分别为2.6%、2.6%、11.9%，提示胃癌前状态与胃癌关系密切。已经证实，胃癌的发生一般从慢性胃炎经过萎缩、肠上皮化生和异型增生，最后到胃癌。一旦发生胃癌，治疗主要以手术和放化疗为主，但术后5年生存率较低。对于慢性萎缩性胃炎癌前病变的个体而言，中上腹症状的反复发作，造成其频繁的就医及检查，更重要的是胃癌发生风险长期威胁着患者生命健康。因此积极治疗萎缩性胃炎癌前病变，降低胃癌发病风险，提高患者的生活质量，成为医患双方的共识和关注焦点。

萎缩性胃炎癌前病变需要积极治疗、随访的策略已然明确，但是几个与治疗相关的关键问题仍然没有得到完善的解决，包括：①治疗的目标点在哪里？慢性萎缩性胃炎致病因素有多种，如幽门螺杆菌感染、胆汁反流、吸烟、维生素C缺乏、胃内酸度下降等均可导致肠化的发生；从机制来看，肠化发生与幽门螺杆菌毒力因子、微卫星体不稳定、肠道特异性转录因子等有关。因而，单一的治疗目标难以解决临床问题。②如果治疗目标点是萎缩、肠化和异型增生，那么这些病理状态是否可以逆转？这个问题也被广泛热议。有许多研究支持根治幽门螺杆菌、黏膜保护剂、抗氧化剂等可以使肠化、萎缩、轻中度异型增生病理状态得到改善，但也有一些文献研究表明，应用上述治疗对病理状态并无改善。③有效的药物或可选方案是什么？目前，抗氧化剂、叶酸和选择性环氧化酶2抑制剂，如维生素C、维生素A、维生素E、β-胡萝卜素、叶酸、塞来昔布成为萎缩性胃炎伴肠化、异型增生临床治疗或研究的新选择，但疗效报道不一，尚无广泛推荐的

共识治疗方案。正是以上存在的问题，萎缩性胃炎癌前病变的治疗变成了难题。

中医药治疗本病主要从自身理论体系出发，认为该病属中医学“胃痞”、“痞满”等范畴，其病位在胃，以脾胃为中心，可涉及肝、胆等脏腑，以虚、滞、湿、热、瘀和毒为主要病机特点。与西医治疗本病比较，中医药治疗萎缩性胃炎癌前病变采用辨证论治和辨病论治相结合的方法，更符合本病多因素致病的综合治疗要求。从文献资料和临床认识来看，中医药能有效改善临床症状及逆转其病理状态。例如一项应用胃萎康冲剂和活力丸治疗萎缩性胃炎的病理结果显示，其对萎缩性胃炎伴肠上皮化生及不典型增生者的有效率分别为87.5％及74.4％；另一项应用中草药治疗萎缩性胃炎伴中重度异型增生病理有效率达到了73.3％。这些资料显示了中医药可以逆转胃癌前病变，是有效的治疗方法。而且一些开发上市的中成药也成为临床医师和患者治疗本病的优先选择，因此中医药被看作是目前解决慢性萎缩性胃炎及其癌前病变临床治疗难题的主要方法。

尽管中医药是目前国内解决萎缩性胃炎癌前病变治疗难题的主要方法，但是仍存在一些问题，限制了中医药在本病治疗中的进一步深化和推广。这些问题有：①对萎缩性胃炎伴癌前病变的病机认识不一。对于本病的病机认识，不同区域或不同医家存在着多样的认识，如有强调肝胃郁热、胃阴亏虚、脾虚湿热、脾虚瘀热、脾虚气滞血瘀、肝郁脾虚等不同，因而反映到辨证分型和治法选择上也就更加丰富多样。如陈晶等对近五年来50篇辨证治疗萎缩性胃炎的相关文献进行分析，共计5107例，辨证分型多达29型。②临床疗效评价存在不足。尽管中医药治疗萎缩性胃炎及其癌前病变的研究文献较多．但尚缺乏有说服力的研究设计。吕冰等查阅近年来中医药治疗萎缩性胃炎随机对照研究（RCT），共检出RCT文献230篇，但高质量的RCT文献仅8篇，Meta分析显示中药组对临床症状改善的总显效率、总有效率及病理学（萎缩、肠化、不典型增生）改善的疗效优于西药组。但综观研究文献，缺乏统一、规范的诊断与疗效评价体系。在各种研究中，采用的诊断标准不下十余种。因此，尽管大量临床研究证实中医药对萎缩性胃炎的治疗有其独特的优势，但尚缺乏在统一规范的疗效评价标准下进行大样本、多中心、高质量的RCT来进一步证实其疗效。③现有中成药缺乏系统比较研究。目前治疗慢性萎缩性胃炎伴癌前病变的中成药有胃复春、摩罗丹、温胃舒、养胃舒、养胃冲剂、胃力康等，尽管各个药物有各自的适应证型和特点，但对于这些中成药的选择使用，临床医生往往只能以个体经验认识作为选择依据，缺乏科学比较的数据。

解决中医药治疗萎缩性胃炎癌前病变这一难题过程中遇到的上述瓶颈问题，可从以下工作入手：①对本病的病机规律、辨证分型标准、治疗方法等达成共识意见，并制定客观、统一的疗效评价体系。②在统一认识、制定规范标准化的临床试验条件下，循序渐进地逐步开展病机、治法、组方的大样本、多中心的随机

双盲对照研究，客观揭示中医药治疗本病的疗效水平，为探索中医药治疗本病的实验研究奠定良好的基础，不断推进本病研究工作的持续深入。

参考文献

陈晶.2007.慢性萎缩性胃炎辨证分型研究近况.实用中医内科杂志,21(1):19～20

陈盘华.2000.中药治疗胃黏膜中重度异型增生60例.中国中西医结合杂志,20(7):545～546

柳梅.1993.中药治疗慢性萎缩性胃炎伴肠上皮化生及不典型增生的临床观察.中医杂志,34(5):285～286

吕宾,黄宣.2007.浅谈治疗慢性萎缩性胃炎及其癌前病变研究中存在的问题.江苏中医药,38(8):8

周海燕,程晔.2003.胃癌前状态577例随诊分析.哈尔滨医药,2(3):2～3

Genta RM.1998.Atrophy,metaplasia and dysplasia:are they reversible.Ital J Gastroenterol Hepatol,30(Suppl3):S324～S325

撰稿人：蔡　淦　张正利　朱梅萍
上海中医药大学附属曙光医院

难治性肾病的中医药干预

Playing Advantage of TCM to Overcome Refractory Kidney Disease

慢性肾脏病（chronic kidney disease，CKD）是临床常见病、多发病，严重威胁人们的健康和生命安全。近 20 年来，由于现代肾脏病学的进展，人们对肾小球的超微结构、分泌因子、发病机制、病理变化、治疗方法的认识大为提高，对肾小管间质性疾病发病机制的认识，尤其是慢性肾功能衰竭（chronic renal failure，CRF）非透析和替代治疗（透析、肾移植）的进展，已使 CRF 的疗效显著提高；过去曾被视为“不治之症”的尿毒症，其患者长期存活率和生活质量均大为改善。然而，肾脏病防治中仍存在着诸多问题，如肾小球疾病发病机制不明确，免疫抑制剂严重的不良反应，临床疗效不高；CRF 早中期防治不得力，透析的非生理性，移植配型方法的不完善及供肾不足，替代治疗的不普及和昂贵的治疗费用等。因此，加强中医防治肾脏病的研究，进一步提高其防治水平和临床疗效，延缓 CRF 病程，提高患者生活质量，降低治疗费用，是中医肾脏病工作者面临的重要课题。

中医治疗肾脏疾病的研究有悠久的历史，特别是 20 世纪 80 年代以来，随着中医对肾脏病认识的深化以及临床经验的积累和实验研究的开展，其疗效及作用机制逐渐被国内外医患人员承认和接受。其中雷公藤治疗肾小球疾病，大黄和冬虫夏草治疗 CRF，得到了广泛的运用和深入的研究。这为进一步的研究工作奠定了基础。

慢性肾脏病中 IgA 肾病及糖尿病肾病（diabetic nephropathy，DN）分别是原发性与继发性肾小球疾病中导致终末期肾病的首位病因，成为慢性肾脏病治疗中的难点。

IgA 肾病指免疫荧光或免疫组化染色见肾小球内存在以 IgA 或以 IgA 为主的免疫复合物沉积；其组织学病变轻者光镜下肾小球基本正常，重则肾小球出现严重的坏死性病变、新月体性肾小球肾炎；晚期则见肾小球硬化和肾小管萎缩。目前认为该病并非一种良性病变，而是一组进展性肾小球病，预后不容乐观，大约 30% 的患者于 20 年后出现终末肾衰竭（end-stage renal disease，ESRD），尤其是病理分级为Ⅲ～Ⅴ期的中重症 IgA 肾病，病情进展迅速，2～5 年内即可发展至 ESRD，且病变多发于中青年，对社会危害较大。由于 IgA 肾病的发病机制尚

不明确，因此到目前为止，现代医学尚无治疗 IgA 肾病的特效措施，加之该病临床、病理表现及预后差别很大，对于治疗时机、治疗策略的选择尚未达成共识。

近年来中医药在 IgA 肾病的治疗中取得了一定进展，目前多数学者主张本病中医病机为本虚标实、虚实夹杂。临证中则根据各自经验从不同的角度进行辨证治疗：有从疾病分期辨证者，以急性发作期与慢性进展期而区别；有按血尿/蛋白尿分类辨证者，归属血尿型与蛋白尿型后再进行辨证论治；有按肾病病理微观辨证者，根据其微观病理表现辨为瘀血、湿热等症而治之。

也有学者提出新的主张。综观 IgA 肾病的发病过程，无论是病变初起因肺系外感或肠道染毒等外邪致病；或是病中因复感诸邪而使病变加重；抑或病程中出现脾肾虚损、水湿泛滥及瘀血阻络等证；甚至病程迁延，浊毒纠结，直至出现肾阳虚衰、肝肾阴虚、阴阳两虚等危重证候，其病变机制总关上、中、下三焦功能紊乱，上下、内外邪毒弥漫，正邪、虚实交错混杂。根据这一病变机转，有人提出重视和解法在 IgA 肾病中的应用，斡旋三焦，和解表里，枢解少阳，燮理升降，使表里内外皆通，通过同步作用达到整体的协调；有人主张 IgA 肾病当从虚、瘀、风湿论治。

综上所述，这些均为探讨中医药治疗 IgA 肾病做出了有益的尝试，积累了丰富的临床经验，也均取得了一定的疗效。但目前其辨证方案仍未趋于统一，分类方法繁多复杂，这对中医药治疗 IgA 肾病的学术研究、推广、发展十分不利，而且有碍于临床疗效的再提高。

今后的研究重点应放在以下几个方面：①通过科学的设计和研究对 IgA 肾病患者进行证候分布的调研，确定 IgA 肾病的辨证分型，寻求其证候演变规律，努力将 IgA 肾病的中医辨证方案规范化和统一化。②利用现代科学研究手段，深入探讨 IgA 肾病微观病理与中医辨证之间的关系；深入研究中医“治未病”学说的现代分子生物学基础，掌握疾病传变规律，从而充分发挥中医理论优势，为攻克这一医学难题做出应有贡献。

DN 是糖尿病最常见和最严重的微血管并发症之一，是欧美等发达国家导致终末期肾衰竭的首位病因。我国糖尿病患者近 4000 万，其中 34.7% 进展为 DN，严重危害人类健康。由于 DN 早期诊断往往被忽视，而一旦进入临床蛋白尿期，病变往往呈不可逆性进展。现代医学对于中晚期 DN 缺乏延缓疾病进展的有效手段，成为治疗的难点。虽然随着肾移植和透析技术的普及，DN 患者的预后得到了极大的改善，但是由 DN 引起的终末期肾病并没有减少，所以寻找新的治疗方法成为目前肾脏病学领域最紧迫的任务。

中医药防治早中期 DN、延缓中晚期 DN 进展方面具有一定作用。如何更好地发挥中医药特色与优势攻克这一医学难题是中医药学者面临的重要课题。

首先，对于 DN 中医病机的认识尚未达成共识。当代学者有从肾立论者，有从脾肾立论者，还提出新的病机理论，如 DN“络脉”病变假说，DN“毒损肾

络”病机假说，DN“微型癥瘕论”病机假说等，由于对病因病机的认识不同，由此而产生了不同的治则治法；其次，中医药对DN有较好的疗效，尤其对于早中期DN取得了一定的成绩，但对于Ⅳ期以上的DN，大多为个案报道或病例回顾，尚缺乏高级别的证据。

由于DN中医症状复杂多变，病因病机虚实夹杂，疾病中晚期病变涉及多个脏腑，症状复杂，单纯病机往往难以概括疾病的全部病机。因此，应进行分阶段、分期的证候学研究，揭示疾病演变过程，同时应从基本证素起步，全面客观采集四诊证素资料，进行基础的证候学研究，分阶段、分期探讨DN病机规律。在此基础上，广泛开展大规模、多中心的临床研究，深入探讨与评价中医药治疗不同时期DN的有效性与安全性，为开发防治早中期DN、延缓中晚期DN进展的新型中药制剂奠定坚实的基础。

综上所述，利用中医脏腑、经络、气血学说及阴阳平衡理论调节机体免疫失调、代谢失衡状态，深入探讨肾病发病机制，从而进一步探讨中西医结合治疗疑难肾病的诊治规律，可以说，肾病领域是中医乃至中西医结合领域中可能有所突破的学科之一。

参考文献

陈莉明.2009.从中国糖尿病防治指南看糖尿病肾病的诊断和治疗.中国实用内科杂志,29(6):513～516

陈香美.2007.发挥中西医结合优势提高IgA肾病的临床疗效.中国中西医结合杂志,27(6):555～556

王琳.2010.陈以平教授诊治中重症IgA肾病学术思想研究.中国中西医结合肾病杂志,11(12):1043～1045

刘基凤.2009.糖尿病肾病的药物治疗进展.现代诊断与治疗,20(6):355～356

美国糖尿病协会.2009.美国糖尿病协会2009糖尿病诊疗指南.糖尿病天地(临床),3(1):546～552

王颖辉,庞博,李景,等.2010.糖尿病肾病病机当代研究述评.中华中医药杂,25(3):327～331

王永钧,陈洪宇,周柳沙,等.2008.从虚、瘀、风湿论治IgA肾病123例临床分析——附69例5型辨治及65例本虚为主辨治的疗效对照.中国中西医结合肾病杂志,9(10):879～882

周柳沙.2008.IgA肾病中医辨证现状及思考.浙江中医杂志,43(9):546～548

A Working Group of the International IgA Nephropathy Network and the Renal Pathology Society.2009.The Oxford classification of IgA nephropathy:pathology definitions,correlations,and reproducibility.Kidney International,76:546～556

D'Amieo G.1998.Pathogenesis of immunoglobulin A nephropathy.Curr Opin NePhrol HyPertens,7:247～250

撰稿人：陈以平　邓跃毅　王　琳

上海中医药大学附属龙华医院

循证医学时代的中医疗效评价

Therapeutic Effect of TCM in the
Era of Evidence-Based Medicine

循证医学的方法已获得世界卫生组织（WHO）及西方国家的普遍接受，用于评价干预措施的疗效和安全性。循证医学的最佳证据包括系统评价（对多个随机对照试验的系统综合）和随机对照试验（randomized controlled trial，RCT）。在缺乏最佳证据的情况下，循证医学的其他证据如非随机的研究将作为决策的依据。当然，临床诊疗决策除了证据之外，尚包括专业技能和经验以及患者的价值和选择。临床干预研究的证据是一个长期的积累过程，从提出假设，进行临床观察，再进行对照研究和前瞻性的随机试验，这些方法的共性是找出干预与结局之间的因果关联，进行统计学的定量分析。然而，这种经典的还原论模式忽略了中医的哲学内涵和人文特征。由于中医药的治疗属于复杂性干预，其评价方法不能仅限于定量的评估，还应当采用社会学的定性研究方法加以评价，以探讨患者和（或）医生的态度、信念、价值观、偏爱等人文因素，进而阐明疗效与文化背景、经验和信任程度的关系，综合、全面、客观、公正地评价中医药的疗效。

中医是一门实践性医学，而疗效则是中医生命力的体现。尽管中医有上千年的历史，迄今仍然广泛使用，中医药在走向国际的今天面临着提供疗效证据的挑战。中医疗效评价方法已成为制约中医药现代化发展的瓶颈。在中医药的现代化发展和与西医的医疗竞争中，所面临的一个重要挑战就是，如何拿出科学界认可的中医药疗效的客观证据。当今国际上普遍认同和推动的循证医学强调严格评价的临床证据。如何把中医治疗的临床经验以科学研究的证据形式呈现出来，获得国际上的公认，是近十几年来中医药科学工作者努力的方向。西医领域广泛接受的现代科学方法在新药评价中发挥了重要的作用，然而当用于评价中医疗效时，存在诸多困惑和方法学的挑战。其中首当其冲的是中、西医两种医学体系的碰撞，体现在疾病防治理念、病因病机理解、诊断及用药方面存在较大差异，难以用现有的评价方法来评价中医的复杂综合性干预体系。其次对中医治病的构成要素缺乏足够的理解，传统的因果关联的还原论显现了局限性，促使人们开始思考中医的人文特征，要求用创新的方法来评价中医疗效。然而，中医的临床疗效评价无论从观念和方法上，都还没有实质性的创新、发展和突破。过去 20 年来大量的中医药临床研究的结果表明，单纯采用临床流行病学的设计、测量与评价

（design，measurement and evaluation in clinical research，DME）方法是远远不够的。实际上在评价过程中把中医的诊疗“简单化”、“西医化”了，把中医与西医的药物评价相等同，结果就是：一方面由于没有体现中医自身的特点和优势，一些临床试验研究片面得出中医治疗无效的结果，使中医界和患者不能信服；另一方面，由于研究的设计、实施和报告中存在的方法学质量问题也使研究结果出现了偏倚，表现为报告的阳性结果过高。因此，进行创新的方法学研究，将是带动整个临床评价发展的关键，对于推动中医临床向循证实践发展、实现中医现代化、国际化具有重要意义。

WHO 倡导循证的传统医学（evidence-based traditional medicine），其目的就是使广泛运用的传统医学疗法有证可循。因此，将循证医学应用于中医药的疗效评价已成为临床医学领域不可抗拒的发展潮流。循证医学的理念和方法引入中医药的临床研究，将在以下几个方面发挥积极的作用：①促进中医药的现代化进程，得到国际医学界的认可；②促进中医药的临床实践从经验医学向以证据为基础的临床实践发展；③通过研究综合法对中医药疗法进行系统评价，找出中医药防治疾病的优势病种和应用领域；④通过严格设计、实施和报告的随机对照临床试验以及其他实用性较强的非随机研究方法，对具有潜力的中医药疗法进行疗效和安全性的评价，为推广使用中医药疗法提供证据基础；⑤通过引入社会学定性研究的方法探讨中医临床评价中的人文因素和影响疗效评价的环境因素，产生具有创新的、示范作用的评价方法和体系。

循证医学核心的三要素包括最佳的、可获得的临床研究证据，专家的技能和经验，患者的价值和选择。可见，循证医学不单是随机对照试验，其试验本身也有局限性。例如，经典的双盲安慰剂随机对照试验就难以体现中医辨证论治的特点，既不能反映中医整体观，也未能考虑研究对象的人文特征、价值取向和对传统医学治疗的偏爱与选择。循证医学的其他方法还包括系统综合法、观察性研究、无对照的病例系列研究和专家的经验积累（证据的论证强度依次减低）。此外，循证医学还注重引入新的评价方法，如社会医学领域的定性研究。通过引入其他学科的方法于中医疗效评价，将体现多学科交叉融合的特点，实现“百花齐放”的中医临床评价体系。

非随机的观察性研究方法主要包括前瞻性队列研究和回顾性病例对照研究。这类评价方法在国际上补充替代医学领域仍占据主导地位，能够作为干预评价的实用方法，同时其结果可为进一步的随机对照试验提供有价值的信息和线索。充分发挥观察性研究的优势，扬长避短，是中医药研究领域的一项重要课题。由于在观察性研究中，临床治疗被视为暴露因素，而不是将实践中的治疗作为研究的干预措施来看待，因此观察性研究更接近于临床实际，其结果具有更大的实践相关性和可推广应用性。

中医个体化辨证论治的复杂性要求对其疗效的评价采用新的方法，可以是几种方法的整合及改良，同时又能得到国际上的承认。经典的随机双盲安慰剂对照试验适用于简单干预的特异性疗效评价，而中医辨证论治体现的是一种复杂性干预，其要素体现在心理、行为、饮食及药物干预的整体调理；传统的评价方法过多地关注药物的作用，尤其是与安慰剂比较的特异性疗效，因此在评价理念和方法上存在局限性。通过探索新的综合评价方法，并结合临床实际应用的示范性研究，就可能推动中医药临床评价向与传统医学相结合的循证医学迈进，从临床应用中验证中医理论，为中医基础理论的发展与突破做出贡献。

通过循证医学对干预评价方法学的系统性研究，找出适用于中医药疗效评价的方法，阐述其各自的优缺点和适用性，提供可供选择的临床评价方法学。

通过对前瞻性随机对照试验进行改良，探讨其在中医辨证论治原则指导下的个体化治疗整体疗效评价的可行性，为评价中医复杂性干预模式提供方法学指导。

通过对观察性研究方法的改进，可提供针对中医预防性干预疗效评价的方法。根据个体证候和社会学特征以及对干预反应性的差异，寻找疗效的规律和影响因素，为继承和发扬传统中医疾病预防理论，提供示范性研究的方法学模式。

总之，临床疗效是评价中医理论科学性的唯一标准。中医学的重要特色就在于重视患病的“人”，强调“以人为本，以患者为中心”的疾病防治理念，亦即“整体观”思想。这种思想决定了中医诊断、治疗、预防、养生、康复等防治疾病促进健康的干预措施的多样性和复杂性。通过临床评价方法的研究，可以使中医疗效的客观性得以体现，并成为国际认可的评价模式，使得中医临床治疗学的理论与方法得以突破，进而弘扬中医学的原创思维、成就和优势，推动临床学科的进步。

参考文献

刘建平.2003.中医药研究随机对照试验质量的现状及对策.中国中西医结合杂志,23(1):62～64

刘建平.2006.中医药临床试验的方法学问题与挑战:循证医学的观点.中西医结合学报,4(1):1～6

刘建平.2007.循证医学方法与中医疗效评价.首都医科大学学报,28(2):212～215

刘建平.2009.循证医学与个体化医疗.中西医结合学报,7(6):505～508

王永炎,刘保延,谢雁鸣.2003.应用循证医学方法构建中医临床评价体系.中国中医基础医学杂志,9(3):17～23

Malterud K.2001.The art and science of clinical knowledge: evidence beyond measures and numbers.Lancet,358:397～400

撰稿人：刘建平

北京中医药大学

中医药治疗肺癌的机制研究

Study on Mechanism of TCM Treating Lung Cancer

原发性支气管肺癌是严重威胁人类健康的常见病和多发病，随着环境污染的加重、人口老龄化的加剧，肺癌的发病率和死亡率呈明显上升趋势，其死亡率在全部恶性肿瘤中升幅最大，已居首位。2006年WHO已正式将肿瘤列入慢性病的范畴。

肺癌的发病率为什么居高不下，肺癌到底是如何发生的呢?虽然目前人类对肿瘤发生机制的认识已从过去的物理致癌、化学致癌、病毒致癌、突变致癌等学说上升到多步骤、多因素综合致癌的理论，但是对于肺癌发生的机制至今仍不明了，研究表明与吸烟、环境污染、职业因子、生物学因子等多种原因密切相关。

肺癌的治疗主张多学科综合治疗，早期肺癌手术是最佳选择，放疗也是主要针对局部肿瘤，但因无法防止肿瘤的复发和转移而导致治疗的失败。临床上多数患者在确诊时已属晚期，已失去手术治疗机会，化疗是一种全身疗法，但是由于其毒副反应，不能长期应用，以化疗为主的多学科综合治疗晚期肺癌的临床疗效达到一个平台期。中医药疗法历史悠久，中医药疗法在改善症状、提高生活质量、稳定瘤灶、延长生存期等方面均显示出明显的优势。中医药治疗肺癌的临床疗效如何?中医治疗肺癌的作用机制和作用靶点的研究成为重大的科学难题。

中医认为肺癌属古代医籍中记载的“肺积”、“息贲”、“咳嗽”、“肺痨”等范畴，其发病机制主要是由于正气虚损，阴阳失衡，六淫之邪乘虚侵袭肺脏，邪滞胸中，肺气𩚡郁，宣降失司，气机不利，血行受阻，津液失于输布，聚而成痰，痰凝气滞，瘀阻络脉，于是痰气瘀毒胶结，日久成为肺部肿瘤。肺癌为正气虚损、痰气瘀毒胶结肺部的疾病，肺癌是一种全身性疾病的局部表现，属本虚标实之证，故肺癌治疗时应根据肺癌的临床分期、病程长短、病情轻重等，在扶正与祛邪、标本兼治的基本原则指导下辨证施治。刘嘉湘等于1983～1990年选择不能手术、放疗的晚期（Ⅲ、Ⅳ期）原发性肺腺癌304例住院患者，用随机法分为中医药组和化疗组（MOF方案），中医药组按照中医辨证分为阴虚、气虚、气阴两虚和阴阳两虚等证型，分别用滋阴生津、益气温阳等扶正中药，酌情运用化痰软坚、清热解毒中药治疗晚期原发性肺腺癌171例，结果病灶缩小稳定率为67.83%，远期生存率治后1、3、5年分别为60.94%、31.86%、24.22%，中位生存期417天（13.9个月），化疗对照组133例，病灶缩小稳定率为48.12%，

1、3、5 年生存率分别为 36.66%、24.50% 和 0，中位生存期为 265 天（8.8 个月）。临床症状改善和生存质量及免疫功能的改善等中药组皆优于同期化疗对照组，取得良好疗效。储大同等将 80 例非小细胞肺癌分为联合化疗（MVP）加康莱特组和单纯 MVP 组；结果 MVP＋康莱特组有效率（CR＋PR）为 45%，MVP 组有效率为 22%，两组有显著性差异。刘嘉湘等采用前瞻性、多中心（5 家医院）、随机对照的方法，对他们研制的国家中药新药金复康口服液治疗非小细胞肺癌进行临床试验，190 例非小细胞肺癌住院患者经随机分入化疗（MVP 或 CAP 方案）＋金复康口服液组和单纯化疗（MVP 或 CAP 方案）组治疗；结果化疗＋金复康组有效率（CR＋PR）为 42%，单纯化疗组（PR）为 23.33%，两组差异显著（$P<0.01$）。显示康莱特注射液和金复康口服液与化疗合用，均可显著提高非小细胞肺癌化疗的疗效。Meta 分析的结果也显示中医药治疗肺癌的特点是带瘤生存。中医药具有调节免疫功能，稳定缩小瘤体，改善症状，提高生存质量及延长生存期的作用，配合放化疗能够减轻毒副作用，提高疗效。目前，中医药疗法不但在肺癌的多学科综合治疗中普遍应用，而且已成为晚期肿瘤的主要治疗方法之一，越来越引起学术界的广泛重视。

中医药是如何治疗肿瘤的呢？中医药抗肿瘤的机制如何？中医治疗肿瘤强调整体观念，注重辨证论治，复方是临床最常采用的方法，中药对机体功能状态的调节过程，涉及分子、细胞、组织、器官和整体多个层面，即使是单味中药，其成分也不是单一的，中药多组分、多靶点的特殊属性，使中药抗肿瘤机制的研究一直是研究的热点和难点。研究表明益气养阴方可提高荷瘤小鼠的 T 细胞数、巨噬细胞吞噬率和吞噬指数以及自然杀伤细胞的杀伤活性；益肺抗瘤饮能抑制裸小鼠人肺腺癌 LAX-83 移植瘤细胞的增殖，免疫组化显示益肺抗瘤饮组的 Ki-67 阳性率低，细胞周期中 S 期细胞数减少，并能抑制肿瘤血管生成；金复康口服液能诱导裸鼠人肺腺癌 LAX-83 移植瘤细胞凋亡，与降低 Bcl-2 基因蛋白表达，增加 Bax 和 Fas 基因蛋白表达等作用密切相关。几十年对中医药抗肿瘤的机制研究初步显示中医药治疗肺癌的多环节、多步骤、多靶点的特点，与增强免疫功能、直接抑制肿瘤生长、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤血管生成等有关。但是对于中医治疗肺癌的机制，我们认识的仅仅是冰山一角，还远远不够深入。

扶正与祛邪相结合，辨病与辨证相结合是中医治疗肺癌的基本原则，“带瘤生存”是中医药治疗肺癌的疗效特点，提高肺癌患者的生存质量和生存期是中医药治疗肺癌的优势，但是中医药治疗肺癌的疗效还有待循证医学证据的进一步证实，进一步提高和发挥中医药在肺癌的多学科综合治疗中的作用是当今肿瘤研究的重要目标。随着肺癌发生分子机制研究的深入，基因组学、蛋白质组学、代谢组学等系统生物学技术的发展，“中药基因组学”和“中药化学组学”概念的提出，为中药的现代化研究提供了新的思路和方向，这些新技术和新方法必将进一

步揭示中医药治疗肺癌的作用机制和作用靶点，使肺癌患者活得更好，活得更长；让中医学为人类的健康做出更大的贡献，同时也是中医药现代化、科学化、国际化必然趋势。

参考文献

陈志峰，李成柱，刘少翔.1999.中医药治疗原发性非小细胞肺癌疗效的Meta分析.中医杂志，40(5):287～289

李大鹏.1998.康莱特抗肿瘤的研究论文集.杭州:浙江大学出版社，192～193

李连弟，鲁凤珠，张思维，等.1997.中国恶性肿瘤死亡率20年变化趋势和近期预测分析.中华肿瘤杂志，19(1):3～9

李涌健，刘嘉湘.1999.益气养阴方对荷瘤小鼠细胞免疫功能的调节作用.中国免疫学杂志，5(4):245

刘嘉湘，潘敏求，黎月恒，等.2001.金复康口服液治疗原发性非小细胞肺癌临床研究.肿瘤，21(6):463～464

刘嘉湘，施志明，徐振晔，等.1995.滋阴生津、益气温阳法治疗晚期原发性肺癌的临床研究.中医杂志，36(3):155～158

孙建立，刘嘉湘.2007.益肺抗瘤饮对裸鼠人肺腺癌移植瘤细胞凋亡相关基因表达的影响.上海中医药杂志，41(10):69～71

许玲，刘嘉湘.1996.益肺抗瘤饮抑制肺癌细胞增殖的实验研究.中国中西医结合杂志，16(8):486

Scagliotti GV，Marinis FD，Rinaldi M，et al.2002.Phase Ⅲ randomized trial comparing three platinum-based doublets in advanced non-small-cell lung cancer.J Clin Oncol，20:4285～4291

撰稿人：刘嘉湘　孙建立

上海中医药大学附属龙华医院

辨证论治个体化治疗的临床疗效评价

Clinical Evaluation of Individualized Treatment Based on Syndrome Differentiation

随着对单核甘酸多态性（single nucleotide polymorphism，SNP）的研究，遗传因素与个体疾病易感性和对药物敏感性潜在联系的发现，使得化学药物个体化应用有了新发展。个性化医疗已经成为临床医学发展的目标。

辨证论治是中医学临床诊疗的主要方法，始创于《伤寒论》，距今已有数千年的历史。辨证论治是以人为中心，以患者状态调整为导向，证-治-效紧密相关的整体、动态、个体化的复杂干预过程。其中个体化治疗是其突出的特点和优势。辨证论治的个体化治疗过程是医生首先通过望、闻、问、切的手段，在收集了患者临床表现及其相关信息的基础上，根据中医理论和个人临床经验“四诊合参”，对病因、病机、病位、病势等进行深入分析和理解；再根据临床治疗的需求，做出证候的判断，制定治则治法，选择合适的治疗方法和方药等。由此可见，辨证论治个体化治疗必须在临床实际条件下实施，是医生根据患者的具体临床表现和治疗反应的临床决策过程。长期以来对临床效果的评价作为辨证论治的重要组成部分，只是停留在对个体患者治疗效果的评估层次上，在患病群体中如何对辨证论治个体化治疗的效果进行评价，没有形成适合的、明确的临床评价方法。目前的对于辨证论治的临床评价方法，基本上照搬了产生于现代医学学科基础上的临床流行病学的理论和方法。几十年来的临床研究实践证明，单纯的照搬，使辨证论治的诊治过程适应临床评价方法的需求而改造，并非能客观地评价辨证论治的效果。如何根据中医“从临床中来，到临床中去”的临床研究模式，构建在临床实际条件下对患病群体辨证论治临床效果的评价理论和方法，提高评价结果的公认度，仍然没有找到一条很好的解决办法。其中的难题主要有以下几点：

1. 临床实际条件下，群体层次辨证论治个体化治疗的临床评价理论与方法学

从古至今，临床评价只是作为辨证论治个体化治疗的一个环节，为临床医生处方用药的决策服务，但如何在临床实际条件下、在患病群体层次，对辨证论治个体化治疗的共性规律和疗效进行评价，缺少相应的理论和方法。其中涉及证候诊断标准、评价标准如何确定，临床实际过程中产生的大量信息如何收集和记录，如何将其变化为可分析的数据；海量临床实际数据如何建模和利用；辨证论

治个体化治疗临床研究对照组如何选择，用何种方法进行分组；利用临床实际信息进行辨证论治的临床研究，是否需要“知情同意”，其中的医学伦理学问题是什么；对于临床实际中辨证论治过程的信息收集，其数据的质量保障与质量控制如何进行等。以上这些问题，都是辨证论治临床评价的难题。

对于在临床实际条件下临床研究问题，国际上在实用性随机对照试验与解释性随机对照试验的讨论中已经有许多可以借鉴的观点。首先，将临床疗效根据产生的条件及临床研究目的不同，区分为效力与效果两种类别。效力是在理想条件下，通过严格纳入和排除标准等控制，与安慰剂对照，反映出干预措施的净效应和相关机制；效果则是在临床实际条件下，与阳性药对照，对不同治疗方法或方案的选择。同时，根据研究目的和研究条件的差别，提出了用于临床实际条件下的实用性随机对照研究，与在理想条件下实施的解释性随机对照试验的设计方法，并开展了一些相应的临床研究。这些都为建立临床实际条件下辨证论治疗效评价理论和方法提供了有意义的参考。

2. 证候疗效及其评价方法

临床评价指标是临床疗效评价中的重要因素。“证候疗效”作为能够体现中医疗效特点的评价指标，备受中医界关注。目前通过给构成证候的症状、体征进行赋分，观察疗前疗后积分的变化，来判断证候疗效，这一方法在中医药界内部尚难达成共识。如何构建能够反映中医整体调节作用的评价指标和方法，是提高辨证论治个体化治疗临床评价结果公认度的关键。但由于对证候认识的不一致性、对证候疗效概念内涵认识的不一致性，都使证候疗效评价问题尚未找到一个大家公认的解决方法，成为辨证论治临床评价中的一个难题。

近些年，国际上生存质量评价指标的大量应用，以及患者报告结局（patient-reported outcome，PRO）量表的研制和应用，为中医整体调节作用的反映提供了较好的借鉴。

3. 在当今医学环境下，如何才能产生“六味地黄丸”类针对证候治疗的新药

六味地黄丸是辨证论治的代表之一。其临床可以用于100多种疾病，来改善患者属于肾阴虚证的疲劳、睡眠障碍、耳鸣、腰膝酸软等。但如何在临床评价中，不涉及“病”而通过对“证候疗效”的评价来确认其疗效，仍然没有找到一个切实可行的解决方法。

参 考 文 献

刘保延.2007.有关辨证论治临床评价若干问题的思考.中医杂志,48(1):12～14

青雪梅,房繄恭,刘保延,等.2008.实用性随机对照试验及其方法学特征思考.北京中医药大学学报,31(1):14～19

王文萍,李晓斌,李晓,等.2008.临床痊愈比例超高时中医症状赋分方法对证候疗效评价的影

响.世界科学技术——中医药现代化,10(5):33～37

吴元胜,陈达灿,禤国维.2005.SLE中医药疗效评价与生存质量研究.中医药学刊,23(9):1596～1597

张蓓.2007.生存质量和中医整体观在肿瘤疗效评价中的意义.中医药管理杂志,15(1):56～58

张军平,王筠,郑培永.2005.对传统中医药临床疗效评价问题的思考.中西医结合学报,3(3):181～183

Macrae KD.1989.Pragmatic versus explanatory trials.Int J TechnolAssess Health Care,5(3):333～339

Schwartx,Lellouch.1967.Explanatory and pragmatic attitudes in therapeutic trials.J Chron Dis,20:637～648

撰稿人：刘保延　张艳宏

中国中医科学院

缺血性脑神经元损伤与中医药干预

Ischemic Brain Injury and Intervention of Chinese Herbs

缺血性中风严重威胁人类生命健康，死亡率和病残率极高。迄今，国内外对其治疗尚无重大突破，已成为医学界的重大研究课题。其中中医药治疗缺血性中风药物的效应及机制研究成为新的研究热点。

1. 缺血性脑神经元损伤相关话题

钙激活钾通道（K_{Ca}通道）广泛存在于中枢神经系统内，对调节神经元兴奋具有重要作用。脑缺血时一方面由于 Na^{+}-K^{+} 泵功能障碍，导致细胞内外离子稳态破坏，出现病理性的 Na^{+} 、Ca^{2+} 通道开放，继而引起细胞内钙超载，兴奋性氨基酸大量释放等一系列病理性损伤事件的发生，最终导致神经元变性和坏死。另一方面脑缺血同时可诱导多种代偿机制的产生，对于拮抗各种病理性损伤事件具有重要作用，其中缺血引起 K_{Ca}通道的激活对调节神经元的兴奋性可能具有重要作用。病理损伤初期神经元损伤引起 Na^{+} 内流增加，膜电位降低，使细胞发生除极，继而促使 Ca^{2+} 内流增加及胞内钙库释放 Ca^{2+} ，胞内游离 Ca^{2+} 增加，K_{Ca}通道被激活，使细胞膜产生超级化，膜兴奋性降低，能量消耗减少，并限制了 Ca^{2+} 内流及钙库释放 Ca^{2+} ，直接或间接减少谷氨酸和其他兴奋性神经递质的释放，降低对脑组织的损伤程度，从而避免一系列损伤事件的发生。因此，脑缺血早期 K_{Ca}通道的激活是神经元自身的一种保护作用，是重要的代偿机制之一。然而这种代偿能力是有限的，随着缺氧损伤时间延长，对 K_{Ca}通道产生抑制作用。所以钾通道开放剂的早期使用正日益受到人们的重视。Takaba 等在光化学诱导大鼠大脑中动脉血栓形成之前，从颈内动脉注入钾通道开放剂（Y-26763），结果用药后脑梗死面积明显缩小。而在一些体外试验中使用钾通道开放剂，不但能有效保护神经细胞，而且能降低谷氨酸等兴奋性神经递质的释放。但目前以天然药物及组分干预钾通道状态少见报道。

中枢神经系统再生障碍是脑永久性损伤的主要原因，长期以来人们探索各种途径试图破解这一难题。然而迄今尚不能从根本上恢复损伤的中枢神经系统（CNS）功能。

最近一种长期被认为抑制神经轴突再生的蛋白质——勿动蛋白（Nogo）被鉴定和克隆，国外学者对此给予很高评价，认为 Nogo 基因的发现是“探索中风患者治疗漫长道路中的一个里程碑”。

NogoR 是 Nogo 抑制成年哺乳动物 CNS 损伤后轴突再生不能所必需的受体，该受体与配体结合可抑制轴突生长，NogoR 表达下调可避免神经元修复机制的进一步损害。Nogo-A 蛋白作为中枢神经的一种髓鞘成分，其基因表达的增加是不利于神经再生的环境因素之一，缺血后 Nogo-A 的增加持续至损伤后一周，因此根据其表达的规律在时间窗内进行基因治疗或阻断其下游的信号通路，将可能成为脑梗死后轴突生长改善和神经功能恢复的新措施。

近年来众多中医学者在长期实践中，逐渐感受到中风发生和演进过程有浓厚"热毒"病理色彩，拟"清热解毒"处理常有良效，以下将逐层剖析之，揭示中风病机、治疗学奥秘，并探索清热解毒中药对缺血损伤神经元离子通道及 Nogo-A 的效应。

2. "热-毒-中风"模式诠释

其一，中风时间维与热毒。中风发生学内容具有鲜明"热毒"色彩，以时间维视角观察，大概有以下特点：①急骤、善变、酷烈性。起病急骤，迅速出现气血运行逆乱，邪热内壅，上扰清窍之象，保留热、邪致病的病机母系特征，然又与一般邪热亢盛有异；其中病情速度明显带有风邪致病痕迹；病情复杂，变化多端，诸证蜂起，显著经络、脏腑气血不畅之象提示有形病邪阻滞，与毒从瘀、痰而生相关。②趋内性。中风起病后，可在极短时间内，热毒之邪迅速攻击脏腑，而呈现相关脏腑功能紊乱，甚至在中风发生前，就可捕捉到热毒趋内入脏的信息。③趋本性。毒本火生，毒为热极。故从热毒时间之箭的运行特征观之，毒当带有明显的火热痕迹。中风预警信号及中风证候学特征均提示，中风的发生与发展含有丰富的热毒信息。"中风将发之前，未有不内热者。热极生风，能令母实，故先辈谓以火为本，以风为标，治法先以降心火为主。心火即降，肝风自平矣。"（《重订灵兰要览·中风》）中风的发生在时间维角度具有毒的急骤、酷烈、善变、趋内、趋本等特征，说明中风与毒有密切的内在联系。

其二，中风空间维与热毒。从空间维视角观察中风发生学特征，大致如下：①广泛性。涉及空间广阔，外而筋脉，内而脏腑；既损气血，又伤阴阳。病变辐射度宽广，以二脏以上等多脏病变为主。"盖风属木，木旺生火，热盛生风，有子母兼化之义焉，其为害也速而烈，其入人也淫而利。所以砭肌肉，侵脏腑，贯经络，透筋骨，靡所不至。"（《医林正印·卷二·中风》）因热为阳邪，其性炎上，而中风病变部位不仅仅是机体上部，其区域更为泛化，非热邪所能涵盖。上述引文谓此由风邪使然，而把"风"作为主要病因抑或主要病理状态，历代医家均未取得一致意见，甚至存在逻辑混乱。本文认为，从中风发生特点上观察，"毒"是独立的致病因素，风则应视作病理状态更为恰当，乃热毒败坏脑窍，损伤筋脉、脏腑后的外在表征。②从化性。中风病因的演化与个体的体质特点密切相关，肝胆火盛是中风发生和发展的重要因素。③火热性。中风的发生均有典型

火热病理过程，具有便秘、烦躁、面红目赤、舌红等症状的中风相对危险度、特异危险度、归因危险比分较高，进而热极生毒，发为中风。④兼挟性。中风发生过程中除热毒为主病机外，痰、瘀常兼挟存在。痰、瘀与毒均是气血离位，异化之产物；而痰、瘀的存在能加重气血不畅，为毒产生和强化提供契机。⑤顽固性。中风病程长，病情重，缠绵难愈的状态表达了火盛生毒的典型特征。一则毒性峻烈，败伤脑窍、筋脉、脏腑则病重；二则火伤津液，腑气不通，毒无去路，故难愈。总之，中风空间维清晰地带有毒的广泛性、从化性、火热性、兼挟性及顽固性信息。说明中风的发生、发展与毒有较强的关联度。

3. 清热解毒——息风之关键

其一，清心疏肝以绝毒源。热极生风，火盛为毒是中风发生、演化的重要病理，故清热泻火解毒即成为息风之关键。火自何来？来自肝、心。证候学研究表明，中风先兆五脏病变以肝、心位居前列，病理证型以肝胆火盛列首位。充分说明心肝火盛在中风发生学中的地位。“内风之动，皆由于肝木之旺，木火生风，是其常态。”（《中风诠·中风总论》）法当以降心火为主，心火降则肝木自平矣。《证治准绳·中风》说“肝主情志，七情失和，五志过极，皆致肝疏泄失司，气郁化火，火盛为毒。”故清心疏肝乃绝毒生源之治本大法。其二，清热泻火以轻毒势。火热为毒之母，母能令子实，故清热泻火可轻毒势。法分三层，已成之热，当以清热兼具解毒之品治之，如蚤休、半边莲、野菊花之辈；上燎之火，当以苦寒直折其势，并引其下行，如夏枯草、生大黄之流；疏通经络，行气活血，使火热之邪顺畅外出，火热即清即泻，其毒势当自轻矣。其三，调气通腑以排毒邪。人体在正常生理情况下有一套动态的、立体的、完善的排毒系统，这套系统主要由脏腑、排毒管道和气血组成。其中脏腑器官本身的功能完善和彼此之间的功能协调，是产生内生之毒和排出内存之毒的物质基础，在管道通畅时，内生之毒可以通过机体的排毒系统将体内之毒排出体外，不致毒存体内损害脏腑器官。只有当毒过强过盛或排毒系统功能发生紊乱时，毒才会留而不去。中风发生时，一方面可因心肝火盛、气血逆乱而生毒，另一方面可因火伤津液，毒败脏腑而腑气不通。生毒亢盛、排毒无权的结果是热毒鸱张，败伤脑窍、筋脉，表征为中风发展。故在上述清心疏肝、清热泻火同时，还应强调通腑调气，以恢复排毒系统的正常功能，使热毒有去路，此谓“通则不毒”、“通则不病”。

综上所述，从证候学和临床研究中发现中风发生学具有鲜明的“热毒”色彩，认为中风发生和演进中，有“毒”的信息存在，中风时空维具备了毒的八大特征。因而，清热解毒法理应成为息风之要键。

我们最新研究采用细胞贴附式和内面向外式观察了缺氧预处理与清热解毒药物预处理对海马神经元 K_{Ca} 通道的影响，结果表明在缺氧状态下，通道活性降低，通道开放概率下降。缺氧预处理与药物预处理能增加通道开放概率，并且随着药物

浓度增加，通道开放概率也增加，显示出一定的浓度依赖性。通道开放概率的增加主要是通过缩短平均关闭时间来实现的，对通道平均开放时间影响不大。缺氧预处理与药物预处理可通过通道直接激活作用机制或是通过胞内第二信使系统对 K_{Ca}通道产生间接激活作用。清热解毒药蚤休也初步表现出对 Nogo-A 的效应。但仍有诸多不解困惑着我们：热毒在不同的季节、发病时辰、性别、年龄对中风发生、发展的影响？中风热毒病机在临床的表达，特征性症状、体征判定以及客观化诊断体系如何建立？清热解毒法、药对中风发生、演化的影响及其机制？人类的进步是与困惑和不解相伴而行，人类的发展是与难题破解相伴而行。厘清热毒与中风，造福人类，是当代中医人的使命，我们责无旁贷。

参考文献

陈宜张.1995.分子神经生物学.北京:人民军医出版社,125

姬志娟,等.2005.李氏5号方对半乳糖老化小鼠海马神经元褪黑素受体和Nogo受体表达的影响.神经解剖学杂志,21(4):377～380

魏江磊.2003.中风热毒论. 北京中医药大学学报,26(1):7

魏江磊.2004.中风先兆证候的性别、年龄及证型考辩. 中医药学刊,22(9):1603

Hammarstron AK,Gage PW.1998.Inhibition of oxidative metabolism increases persistent sodium current in rat Cal hippocampal neurons.J Physiol Lond,510(Pt3):735～741

Ngce,Tang BL.2002.Nogos and the Nogo 66 receptor;factors in habiting CNS neuron regeneration.J Neurosci Res,67:559～565

Wang Kc,Koprivicav,Kim JA,et al.2002.Oligodendrocyte-mylin glycoprotein is a Nogo Yecepter ligand that inhibits newrite outgrowth.Nature,417:941～944

Yamamoto S,Tanaka E,Shoji Y,et al.1997.Factors that reverse the persistent depolarization produced by deprivation of oxygen and glucose in rat hippocampal Cal neurons in vitro .J europhysiol,78(2):903～911

Zhang L,Krnjevic K.1993.Whole-cell recording of anoxic effects on hippocampal neurons in slices.J Neurophysiol,69:118～127

撰稿人：王　左　魏江磊

上海中医药大学附属曙光医院

糖尿病微血管并发症的早期干预

The Prevention of Diabetic Microvascular Complication with TCM

糖尿病微血管并发症包括糖尿病视网膜病变、糖尿病性周围神经病变和糖尿病肾病，是糖尿病患者主要的慢性并发症，尤其是糖尿病肾病和糖尿病视网膜病变，是糖尿病致残、致死的主要原因。如何在疾病的早期找到预防这类疾病的高危指标，进而早期监控、干预治疗是研究者共同关注的焦点。

中医在糖尿病微血管并发症的防治方面积累了丰富的临床经验，理论上，强调“治未病”、“既病防变”；临床实践中，除强调“辨证施治”，近年来也开展了一系列单药、单方或药物有效成分的研究，获得了一定的临床疗效，但其疗效还有待进一步规范化研究的证实。

在糖尿病肾病防治方面，持续存在的微量白蛋白尿（30～300mg/24h）是糖尿病肾病最主要的早期诊断线索。一旦出现非选择性蛋白尿，提示肾小球基底膜滤孔已发生改变，进入肾实质性损害期，此时即使给予恰当的治疗，亦不能使其逆转，这是糖尿病肾病治疗的难点。糖尿病肾病属中医“下消”、“肾消”范畴。早在隋代的《诸病源候论 · 渴利候》中就有“其久病，变成发痈疽，或成水疾”的记载。唐代《外台秘要》中保存了治消渴方 15 首，其中就有预防水肿方 3 首，说明古人已有了早期干预的防病意识。近数十年的临床实践积累也证明中医在治疗糖尿病肾病方面，确实具有优势。如针对脾肾阳微、瘀浊留阻的病机，可选择《三因极一病证方论》中具有益气养阴、滋肾温阳作用的鹿茸丸和《广瘟疫论》中通阳泄浊的加味虎杖散复合，治疗糖尿病肾病效果显著。

糖尿病增殖性视网膜病变，为眼科四大致盲原因之一。目前临床缺乏早期诊断方法，一旦出现异常改变，大多数已不可逆转，这是糖尿病微血管病变治疗的又一难点。近十年来，一些先进的诊疗仪器，如激光多普勒流速仪的应用有望解决这一问题。这些诊断方法可反复测定视网膜血管口径和血流速度，是研究糖尿病视网膜血流动力学的有效手段，有利于早期掌握眼底动脉系统的低灌注状况和造成视网膜局部微循环缺血缺氧和静脉系统淤滞的可靠信息，是研究糖尿病视网膜早期病变和早期干预视网膜病变的重要手段。

有关糖尿病视网膜病变的中医文献，可上溯至金代。明代戴思恭《证治要诀秘录》中记载有“消证既久，精血既亏，或目无所见，或手足偏废如风疾，非风也”，其中“消证既久，精血既亏”是“目无所见”的根本。因此，采用滋肾涵

肝、凉血散血的中药复方早期干预，使视网膜系统无灌注区的情况得以改善，有望减少增殖期视网膜病变的发生概率，从而降低糖尿病致残率。

现代医学研究表明，严格控制血糖是防治糖尿病微血管并发症的有效手段。“糖尿病控制与并发症试验（DCCT）”结果显示：严格控制血糖可以使1型糖尿病患者发生糖尿病视网膜病变的危险性降低76%、发生糖尿病周围神经病变的危险性降低60%、发生糖尿病肾病的危险性降低35%。而另一项著名的“英国糖尿病前瞻研究（UKPDS）”发现：严格血糖控制可以使2型糖尿病患者总的糖尿病并发症危险性将降低12%，发生糖尿病视网膜病变及糖尿病肾病的危险性降低25%。但在全球范围内，血糖达标率（HbA_{1c}<6.5%）仅15%，在发达国家，如美国血糖达标患者也不足25%，我国2003年部分地区的达标率仅有11.5%。因此，在糖尿病肾病和糖尿病视网膜病变早期采用中药复方干预治疗，是降低糖尿病微血管并发症的致残率和致死率的有力措施。

要进一步解决本难题离不开两个问题的解决：一是中医药疗效的临床验证，二是中医药作用机制的阐释。

要证实中医药的疗效必须借鉴循证医学方法，尽可能多地开展高质量的临床研究，提供高级别的临床研究证据，从而为系统评价中医药疗效提供基础，为临床决策提供科学依据。

作用机制方面，近十年来中医药对糖尿病微血管并发症的多个发病机制的作用得到证实，尤其是对多元醇通路及终末糖基化产物（AGEs）形成的影响的研究较为深入。但由于糖尿病微血管并发症的发病机制仍未全面阐明，故中医药的作用机制还有待进一步研究。近年研究表明，氧化应激水平增加可能是糖尿病微血管并发症的共同发病机制。氧化应激主要由反应氧产物（ROS）介导，ROS作为重要的细胞内信使，可以活化几乎所有已知的信号转导通路。高糖状态下线粒体电子传递链产生过多的ROS，通过抑制三磷酸甘油醛脱氢酶活性激活包括蛋白激酶C旁路、多元醇旁路、已糖胺旁路及AGEs形成等各项机制进而引发糖尿病并发症的发生。中药中存在大量的抗氧化物质，包括茶多酚、类黄酮、苯乙烯酸、香豆素、单萜、丹宁酸、三萜等，因此进一步开展这方面的研究将有助于阐明中医药防治糖尿病微血管并发症的作用机制，同时也有可能开发出更有效的中药新药。

参考文献

丁学屏.2009.糖尿病血管神经并发症病因病机分析.上海中医药大学学报,23:5～7
黄帝内经·素问.1956.北京:人民卫生出版社,81,86,100
潘长玉.2005.中国糖尿病控制现状——指南与实践的差距.国外医学·内分泌学分册,25(3):174～178

三因极一病证方论.1957. 北京:人民卫生出版社,136～146

外台秘要.1993. 北京:华夏出版社,200

Brownlee M.2005. The pathobiology of diabetic complications:a unifying mechanism.Diabetes, 54:1615～1625

Ceriello A,Motz E.2004. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance,diabetes,and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited.Arterioscler Thromb Vasc Biol,24:816～823

Stratton IM,Adler AI,Neil HA,et al.2000.Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35):prospective observational study. BMJ,321:405～412

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group.1993.The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus.N Engl J Med,329:977～986

撰稿人:丁学屏　任建萍　陆　灏

上海中医药大学附属曙光医院

子宫内膜异位症的疼痛与复发

The Pain and Recurrence of Endometriosis

子宫内膜异位症（endometriosis，EMs）是指具有生长功能的子宫内膜组织出现在子宫腔被覆内膜及宫体肌层以外的其他部位，主要发生于盆腔脏器，称为盆腔子宫内膜异位症（pelvic endometriosis，PEM）。EMs 是妇科常见病、疑难病之一，其主要症状是痛经、性交痛、慢性盆腔痛及不孕。EMs 虽是一种良性疾病，但有类似肿瘤的生物特性如侵袭，且和透明细胞卵巢癌联系紧密，有 1%～2% 的子宫内膜异位症可发生恶变。EMs 所引起的痛经和慢性盆腔疼痛会严重影响患者的工作和学习，也影响到患者与家人的关系。此外，EMs 的治疗费用高昂，患者人均每次手术，加上术后用药及住院费（不计误工损失），总费用可高达约 2 万人民币。如此高昂的费用，对于患者及其家庭是一个巨大的负担。加上 EMs 的高发病率，用于治疗 EMs 的医疗费用及误工损失，对社会是巨大的经济负担。因此，EMs 业已成为一个严重的公共卫生问题，严重影响广大妇女的健康、生活质量和工作效率。更有学者认为，EMs 是一个社会疾病。

EMs 在普通人群中发病率高达 10%～15%，在患有不孕或慢性盆腔痛的妇女中其发生率可达 30% 以上。手术和药物治疗为 EMs 的常用治疗方法，但术后 5 年的复发率高达 40%～50%，药物治疗后 12～24 个月复发率高达 50%，形成复发性盆腔子宫内膜异位症（RPEM）。RPEM 指 PEM 患者经手术或规则药物治疗后，症状、体征已消失，疾病治愈，但经过几个月（一般 3 个月）症状和（或）体征重新出现。由于复发导致的多次手术治疗又会造成生殖内分泌功能的紊乱，增加卵巢早衰的风险。EMs 的相关疼痛及复发是目前临床面临的两大难题。

疼痛的治疗是 EMs 治疗的关键及难题。EMs 可引起各种不同种类不同程度的疼痛，包括痛经、性交痛、排便痛、慢性盆腔痛（chronic pelvic pain，CPP）、腰背部疼痛以及放射至部分内脏及肢体的疼痛等，RPEM 的常见症状也是疼痛的复发，严重地影响妇女的健康和生活质量。目前对 EMs 疼痛的治疗方式主要包括手术治疗、药物治疗及手术与药物联合治疗。虽然手术切除能有效缓解大部分患者的疼痛，但仍有部分患者手术疗效不理想。Ⅲ～Ⅳ期 EMs 术后年复发率高达 10%～20%。RPEM 手术治疗是细胞减灭性治疗，而非治愈性治疗，仅靠手术难以治愈，再次手术后又易复发，故药物治疗更为重要。单纯药物治疗可减

轻疼痛，对病情较轻且无生育要求者，有暂缓手术的功效；术前用药抑制卵巢功能，可减轻炎症反应和盆腔充血并软化粘连，提高手术的安全性和成功率；术后用药抑制卵巢功能，可阻止或减少异位内膜细胞的播种，延缓复发，预防残余病灶癌变的可能。循证医学资料表明，保守性手术后用药疗程以 6 个月为宜，比 3 个月更能降低疼痛复发率。

目前对于 EMs 疼痛研究的难点主要在于：①并不是所有的 EMs 都会引起疼痛。②EMs 患者可能合并其他可以引起疼痛的因素，如合并间质性膀胱炎、肠易激综合征或骨骼肌肉疼痛等。③ 目前对于 EMs 的顽固性痛经，手术及药物治疗效果都不满意。EMs 病灶的数目与疼痛程度往往无相关性。④中医药以其疗效确切、不良反应小、能够长期用药的优势，越来越受到国内外专家的重视，也受到 EMs 患者的接受。中医药采用活血化瘀，达到“通则不痛”为 EMs 的药物治疗途径之一，能减轻 EMs 的疼痛，减少复发，但远期疗效及复发的机制尚未明确，还缺乏高级别的证据。因此 EMs 的疼痛机制还需进行大量的临床及基础研究，从而为进一步完善 EMs 疼痛治疗策略提供新的思路。

复发已成为临床医生治疗中的另一个非常棘手的问题。EMs 虽是一种良性疾病，但复发是其特点之一，同时也是临床处理的难点。其复发率高、复发时间短等已严重影响了患者的生活质量，且目前对于 EMs 的复发机制了解甚少。多数学者认为系残留病灶重新生长，但新发病灶也有可能。其确切机制尚不清楚。尽管很多临床医师采取术前和（或）术后联合应用药物治疗等措施。但 RPEM 发生率仍达 6.1%～40%。近年来，国内 EMs 发病率还有着高发、年轻化趋势，因此 EMs 对妇女健康的危害性不容忽视。解决复发，积极防治 EMs，具有重要的社会和经济意义。EMs 是一个良性疾病，但有恶性生物学行为。如何降低复发率，争取术后痊愈或药物治疗完全控制以提高患者生活质量及生育能力是研究的热点。目前关于 EMs 复发的相关机制尚未明确，关于 EMs 的复发率以及复发高危因素，复发预测的生物学标志物，各个研究的报道尚不一致。临床上也发现多种因素可能通过多种途径影响 EMs 的复发，因此需要进一步寻找 EMs 复发的关键因素，运用各种方法加以阻断从而达到防止复发，争取彻底治疗的目的。EMs 的复发已成为临床一个十分棘手的问题，而 EMs 复发的机制还不甚明确，如何运用现有的理论知识指导临床治疗以求达到减少 EMs 复发的目的是我们面临的一个难题。因此对 EMs 复发机制的进一步探讨，探索建立复发风险评估体系以及有效干预复发的措施，开发出可针对性并有效地对复发高风险患者进行干预的药物显得尤为迫切，这对于缓解社会经济负担、改善患者的生活质量具有重要意义。

参考文献

陈棣仪,石一复.2002.240例盆腔子宫内膜异位症术后复发的探讨.现代妇产科进展,11:424～426

韩秀青,周应芳,任霞.2007.复发性盆腔子宫内膜异位症的诊治进展.北京医学,29(1):47～49

李晓燕,冷金花.2009.子宫内膜异位症疼痛研究进展和治疗策略.国际妇产科学杂志,36(3):225～227

周应芳.1994.子宫内膜异位症开腹手术后再次盆腔手术(附22例分析).现代妇产科理论与临床(七).成都:四川科学技术出版社,126～128

Dmowski WP,Radwanska E,Rana N.1988.Recurent ell dometriosis following hysterectomy and oophoreetomy:the role of residual ovarian fragments.Int J Gynaeeol Obstet,26:93～103

Farpuhar C.2007.Endometriosis.BJM,334(7587):249～253

Revelli A,Modotti M,Ansaldi C,et al.1995.Recurrent endometriosis:a review of biological and clinical aspects.Obstet Gynecol Surv,50:747～754

VerceUini P,Crosinignani PG,Fadini R,et al.1999.A gonadotrophin releasing hormone agonists compared with expectant management after conservation surgery for symptomatic endometrio-sis.Br JObstet Gynaecol,106:672～677

撰稿人:朱南孙　张婷婷　赵　莉

上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院

冬病夏治外治法的理论与机制研究

Theroy and Mechanism of Winter Disease Being Cared During Summer

“冬病夏治”是中医治疗疾病的特色方法，早在《素问 · 四气调神大论》中就曾记载“夫四时阴阳者，万物之根本也。所以圣人春夏养阳，秋冬养阴，以从其根”及“以夏之阳盛之时，助素体阳虚之体”等理论，选择“夏之阳盛之时”针对冬病进行治疗。《管子 · 形势解》云：“春者，阳气始上，故万物生；夏者，阳气毕上，故万物长；秋者，阴气始下，故万物收；冬者，阴气毕下，故万物藏。”按照中医学天人相应的说法，人体的阳气与自然界的阳气相一致，生于春，旺于夏，收于秋，而藏于冬。夏天是一年中阳盛阴衰之季，“三伏”又是一年中阳气最旺盛的季节，人体的阳气也随之达到顶峰，此时为恢复人体阳气最佳时机，若以阳克寒，驱散患者体内的阴寒之气，将冬病之邪消灭在蛰伏状态，可以达到“冬病夏治”的目的。

冬病一般指某些好发于冬季，或在冬季加重的病变。如感冒、支气管炎、支气管哮喘、骨质增生、颈椎病、肩周炎、急慢性腰腿痛、骨关节病、慢性肾炎、慢性阻塞性肺气肿、过敏性鼻炎、皮肤冻疮、风湿性关节炎与类风湿关节炎等，这些疾病常由于阳气不足、肺气虚弱及虚寒疼痛以及免疫力功能下降而导致。“夏治”，指的是在夏季这些病情有所缓解的时候，进行辨证施治，以期通过改善人体的阴阳平衡，从而减少和预防“冬病”的发生。冬病夏治常采用的治疗方法有穴位贴敷、穴位艾灸、穴位注射、拔罐、刮痧、中药内服、药膳等，其中以贴敷外治法在临床应用最广。

近十年来时间医学在我国得到了迅速发展。时间医学是现代医学与时间生物学相结合的产物。时间医学研究时间与人体生理变化的关系，如人在一年四季中的情绪和体力变化，昼夜之间激素水平的变化，人体的免疫功能随季节、昼夜发生的变化等。有些疾病集中在一年中的某季或某月，或一月中的某日，或一日中的昼、夜或某时发生；有些药物对疾病的治疗作用在某个时间段效果好一些；有些疾病的患者在某个季节或某个时辰死亡率较高。这些可能与生物钟基因密切相关。生物钟基因突变可使机体节律周期延长或缩短，从而造成机体与环境失同步，导致节律失常性疾病。了解时间医学的目的在于顺应自然规律，在生理节律处于低峰期时避免致病因素的侵扰，同时主动地维系不宜破坏的自然节律，维护自身健康。这一发现早在《灵枢 · 顺气一日分为四时》中就有“夫百病者，多以

旦慧，昼安，夕加，夜甚”的记载。中医“天人相应”的理论认为，人与自然界是一个统一的整体，人们只有顺应它的变化并及时调节自己，按照“天、地、日、月、星辰”的变化规律，才可以使自己生活节律中的同步因子不断维持动态平衡，以达到顺时养生的目的。

外治法冬病夏治，既符合中医“天人相应”、“治未病”的理念，又结合中医独特的外治贴敷疗法，具有鲜明的中医特色，深受群众欢迎。现代医学研究也表明：盛夏人体皮肤血液循环旺盛，汗腺及毛细血管普遍开放，通过外用局部给药，药物吸收快，皮肤给药除了局部作用显著外，还可透过皮肤进入全身血液循环，且皮肤间层有储存作用，使药物浓度曲线平缓，避免了口服或注射给药中时间-血液曲线上表现出的峰谷现象，且不经口服，从而避免胃肠道消化液及肝脏首过效应等因素的影响，能充分地发挥药物的作用。现代药物吸收机制的研究表明：角质层的含水量与环境相对湿度有密切的关系，药物敷贴，使局部形成一种汗液难以蒸发扩散的密闭状态，使角质层的含水量从5％ ～10％增至50％，角质层经水合作用后，可膨胀成多孔状态，易于药物穿透，一般药物如能通过表皮，都易于被真皮吸收。研究发现，中药敷贴治疗支气管哮喘，伏天治疗组患者IgE、IgG明显改善，而且补体C3显著上升；体内干扰素水平明显提高，细胞免疫功能增强；嗜酸粒细胞绝对值降低，降低机体的过敏状态，减少了哮喘的急性发作次数。伏天用药，药物在经络的作用下，经神经-内分泌-免疫系统的调节，体内生物效价明显上升。从报道情况来看，大部分患者有效，且远期疗效稳定，特别是对于慢性支气管炎、哮喘和肺心病等，可以提高机体免疫力。

冬病夏治外治法在临床应用报道颇多，但仍存在问题：①大多缺乏严谨的科研设计，疗效评定标准不统一，回顾性总结较多，前瞻性研究及随机对照观察研究较少，结论缺乏科学性、可比性及可靠性。②中医药治疗是一种基于医生个人技能和经验的干预措施，这使内病外治的辨证取穴和贴敷药物的选择缺乏统一标准，中药外用剂型陈旧，剂型稳定性、可靠性不够，一些有毒外用制剂的质量控制、药效、代谢途径等仍然不够明确。③冬病夏治主要是通过外治法提高患者的免疫力，但其具体作用机制及如何在血液中进行调节免疫因子，又是通过何种途径起效仍有待于深入探究。因此，从免疫学角度研究冬病夏治中患者免疫力功能发展变化，认识人体阳气盛衰与节气变化规律，以期利用现代科学技术探索其作用机制，丰富和发展中医冬病夏治理论，将是中医工作者面临的一个重大难题。

解决上述问题应对疗效评定等多个内容进行量化、客观化，使之具有科学性、规范性及可靠性，并以中医基础理论为指导，深入研究中医内病外治的辨证用药、临床取穴规律，加强有效治疗药物及穴位的临床验证和筛选，尤其在药物的剂型方面，除对局部刺激观察外，更应对其综合毒性以及中药在皮肤内的酶解动力学进行研究观察。此外在探讨其作用机制上，还需要进行多学科交叉应用研

究，如信息科学在时间生物医学方面的应用研究，包括中医针灸时间治疗学——子午流注、计算机应用软件、智能型时间生物医学、动物实验柜系统等，积极引入时间医学的研究方法和手段，以期从分子基因角度探讨“冬病夏治”提高机体免疫力的途径和机制，为中医“冬病夏治”提供客观的理论依据。

参 考 文 献

沈利华.2001.支气管哮喘的冬病夏治临床研究.实用中医药杂志,17(4):3～4

史正方,王繁宏.1995.敷贴为主防治支气管哮喘 328 例.辽宁中医杂志,(7):319

阎怀士.1992.穴位敷贴对哮喘患者血清干扰素的影响.上海针灸杂志,(2):77

阎星诗,洪素兰.2009.中医时间医学研究述评.世界中西医结合杂志,4(2):143～144

严光俊,丁淑彦.2006.冬病夏治的研究近况.Journal of External Therapy of TCM,15(2):54～56

Aiber MK.1984.Skin permeability: dermatology aspects of transdermal drug delivery.Am Heart,10(8):200

Vyas SP Gogoi PJ,Jain SK.1991.Development and characterization of pseudolatex based transdermal drug delivery system of diclofenac.Drug Dev Ind Pharm,17(8):1041～1058

撰稿人：郑　锦　刘　胜

上海中医药大学附属龙华医院

推拿手法治疗疾病的机制

Mechanism of Massage Therapy on Diseases

推拿是医生用双手在患者身体上施加不同的力量、技巧和功力刺激某些特定的部位来达到恢复或改善人体的生机、促使病情康复的一种中医传统疗法。几千年来在我国不断地得到发展、充实和提高。

推拿对人体诸多系统均有影响，在血液流变学、生物化学、生物力学、空间解剖位置各个方面，都能促进生理功能趋于积极的变化，这种变化又和肌肉骨骼、血管、神经-体液、内脏体表感受器、关节韧带等紧密相关。所以，其作用机制的研究显得十分复杂。在人体内通过对推拿手法治疗疾病作用途径的阐明，将回答临床医生及医学基础研究工作者所共同关注的基本问题：推拿手法在医生和患者间的能量是如何进行转换的？这些能量转换能产生怎样的影响？这些影响的具体产生机制是什么？推拿手法通过操作者与受术者之间的能量转换来实现治疗作用，因此要解释“推拿手法治疗疾病的机制”，最根本的就是要阐明推拿手法作用于人体时能量的吸收、转换与耗散问题。

推拿疗法的基本治疗原则是：治病求本，扶正祛邪，调整阴阳，因时、因地、因人制宜。遵循中医学“整体观”理论。同时推拿疗法又是一种物理疗法，同样遵循物理学“能量守恒定律”。能量吸收是推拿疗法作用的基础或者说是作用的根本。因为能量是改变受术者生理病理的原因，所以要取得长久或永久的改变，必须让能量长久或永久存留在受术者体内，宏观的物质改变如人体骨骼的结构势能存留、微观的改变是化学能，这两种能量有附着能力。其他可列举的动能、势能、热能、电能等都难以存留，必须再进行其他形式的转换。好在无论是生物界还是非生物界，各种形式的能都是可以互相转换的。

推拿主要依靠手法的力做功来防治疾病，所以推拿主要使用的原始物理因子为动能。动能经过接触传导进入受术者躯体后，可以与各种组织结合产生多种转换模式，常见的有：

（1）热能转换。这种现象可产生于任何组织与体液、外界与体表之间，由于相对运动的摩擦生热，广泛、简明、不需要机体特殊功能辅助，实现了推拿疗法与温热疗法之间的大转换，之后将遵循温、热疗法的作用机制防治疾病。

（2）直接分子键能转换。外力超过组织的强度极限时，内部结构破坏，大量动能转换为破坏处的分子键能（界面能）是推拿治疗少数疾病的主要机制，如人

体的主要组成物质——蛋白质，是主要的提供丰富多样能量转换的功能单元。共价键维系多肽链是一级结构；氢键、盐键、疏水键使多肽链盘曲折叠成复杂多变的空间结构，产生各种功能。当外因作用使其非共价键断裂与重组时，空间构象改变，功能随之改变，从而使机体适应千变万化的外环境。

（3）骨骼结构势能转换。由于正常的人体软组织具有“初始弹性应力”，当关节脱位下的软组织应力小于正常关节结构的应力时，整复关节手法必需有一些动能转换为弹性势能。当然，同时还需一些动能损耗为整复路径中的摩擦热能。

（4）感受器神经电能转换。多种神经感受器具有将合适机械能转换为生物电能的功能，之后生物电能通过神经系统和效应器的功能实现向目标部位传导和向化学能转换的目的。推拿界把神经电能转换的机制作为主要作用机制之一，如“六种作用机制”解说。

（5）骨骼压电效应的转换。当外力压迫骨骼变形时，在压应力侧产生负电位、在张应力侧产生正电位。电位则可改变未分化间充质细胞、成骨细胞和破骨细胞的功能，影响骨重建和修复的过程。

（6）直接转换为“净聚集能”。聚集现象是红细胞表面能量平衡的结果。净聚集能是两个相邻红细胞膜上高分子化合物之间的桥接能减去由红细胞表面带负电荷所造成的静电排斥能、膜应变能和引起解聚的切应力所做的功。当动能加大血液切变率时，大量红细胞叠连体解体，血黏度因内溶颗粒变小而大幅度降低，物质运输加快。

推拿手法通过能量转换作用于人体，推拿操作时这些能量产生力学刺激信号，体内细胞如何识别所受手法力学刺激信号，并将力学信号转变为电生理及化学信号，进而引起一系列生物学效应，达到治疗疾病的目的，是阐述推拿疗效机制的关键。在机械应力的作用下细胞骨架的所有构件为了分散张力和压力而发生整体重排，从而导致细胞发生形变，细胞形状调节发出的调节信息以力的形式传递。因此，机械应力的变化可以通过细胞及其骨架内的力平衡而对细胞的生长和生化性质产生影响。

能量的转换和信号的转导过程必然导致生物体内物质结构的改变，通过这些改变实现对生物体各系统的调节作用以求产生局部或全身性的生理反应，最终影响病理过程而起到治疗作用。在此过程中“神经-内分泌-免疫”调节机制占了主导地位，神经系统与内分泌系统之间相互影响、相互调节。推拿通过刺激神经系统分布在皮肤、肌肉、关节、骨骼及内脏等处的感受器，影响中枢神经系统，通过下丘脑的作用对垂体和靶腺进行调节；通过神经与免疫系统之间特有的“神经-内分泌-胸腺轴”对免疫系统功能进行调节，通过这些调节将产生相互作用的介导物质。

通过目前的研究成果，我们可以将推拿手法治疗疾病的机制总结为图1。

如上图所示我们可以对推拿疗法防治疾病的机制得到初步的认识，但这些不足以解释其全部的治疗机制。因为在动能转换后的能量耗散过程中所产生的变化

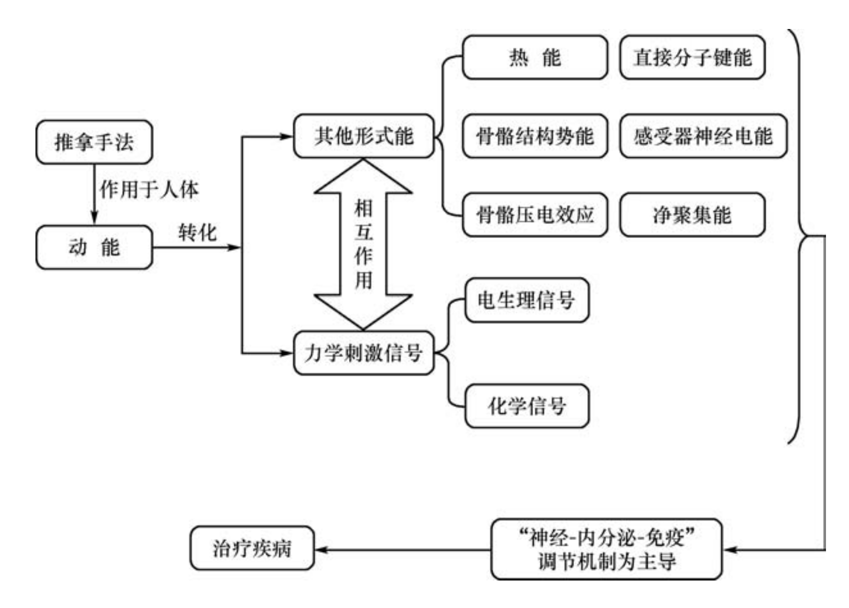


图 1 推拿手法治疗疾病的机制

远比我们所认知的复杂。每一个成功的实践背后，一定有一个正确的相关理论的支持。在对推拿疗法治疗疾病机制的研究中目前还缺乏这种相关理论的指导和借鉴。推拿疗法是一种物理疗法，必然遵循物理学定律，其中“耗散结构理论”是比利时化学家普利高津在研究不违背热力学第二定律情况下，如何阐明生命系统自身的进化过程时提出的新概念。自 1969 年普里高津在理论物理与生物学会议上正式提出了耗散结构概念之日起，便对医学研究领域产生着深远的影响。

什么是耗散结构？通俗地讲，就是一个远离平衡的包含有多组分多层次的开放系统，在外界条件变化达到一定阈值时，经“涨落”的触发，量变可能引起质变；系统通过不断与外界进行物质和能量交换，在耗散过程中产生“负熵流”，就可能从原来的无序状态转变为一种时间、空间或功能的有序状态。这种非平衡态下形成的新的有序结构，就是耗散结构。人体作为一个耗散结构，必须是对外环境开放的，它与外环境之间，存在着密切不可分割的动态平衡关系，外环境是每个耗散结构摄取信息、能量、物质的源泉。如果外环境的条件改变了，耗散结构与外环境之间原有的信息、能量和物质交换的动态平衡过程被打破了。此时，耗散结构内部的自组织运动及其结构必须做相应的调整，以适应外环境的不断变化，否则，这个耗散结构就会解体。所以，生命体内的此种“自适应功能”应是自组织功能的动态属性。推拿手法作为“耗散结构理论”中的“外环境”可能就是通过提高机机体的这种“自适应功能”来实现其治疗作用。

“耗散结构理论”强调通过能量交换，在耗散过程中产生“负熵流”，就可能从原来的无序状态转变为一种时间、空间或功能的有序状态。通过上述的能量转

换和信号转导使人体达到有序状态，从而达到治疗疾病的目的。那么上述的转换形式所产生的物质或信息就是“负熵流”。在“耗散结构理论”中人体是一个远离平衡的包含有多组分多层次的开放系统，在外界条件变化达到一定阈值时，经“涨落”的触发，量变可能引起质变。

“耗散结构理论”提出“非平衡是有序之源”的观点。非平衡是有序之源，即不稳定是产生新结构的动力。人体就是依靠与外界交换物质和能量维持着的耗散结构。人体本身是一个远离平衡态的开放巨体系，时刻都处在有序—无序—有序的转化过程中，机体借助新陈代谢的作用，通过外部和内部催化，在实现外部无序性增大的同时，使内部的有序性相应得到发展。

目前对于推拿疗法的机制研究越来越受到重视，无论从生理、生化、力学还是信号转导方面的研究都取得了初步的研究成果，但缺乏有效的理论支撑。自“耗散结构理论”提出起，对医学的启示就受到医学界的广泛重视，以“耗散结构理论”为基本理论框架对推拿疗法治疗机制进行深入研究，将给广大研究者提供新的思路与方法。

参考文献

曹仁发.1992.中医推拿学.北京:人民卫生出版社,107～108,145～416
范少光,丁桂凤.1995.神经内分泌与免疫系统之间相互作用的介导物质:共用的生物学语言.生理科学进展,(26):175～183
高文颖,刘义,李伟,等.2004.耗散结构理论在生命科学研究中的应用.大学化学,4(19):30～34
郭仁,张和君,董德祥.1990.分子细胞生物学.北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,10:26
何萍芬,岳小欣,张长辉.2007.耗散结构理论及其在医学上的应用.中国组织工程研究与临床康复,39(11):7999～8001
路易斯C金奎拉.1982.基础组织学.沈宝容译.济南:山东科学技术出版社,179
罗志瑜,袁宝国.1990.推拿手法深透力热效应实验观察.上海中医学院学报,4(2):21
门志涛.2008.中医推拿舒筋作用机制研究.按摩与导引,3(24):10～13
孟和,顾志华.1994.骨伤科生物力学.北京:人民卫生出版社,66～89,105～107
邵铭熙.1998.实用推拿学.北京:人民军医出版社,257～259,375
杨桂通.1997.医用生物力学.北京:科学出版社,66～136,223
朱明德.1996.现代临床生物化学.上海:上海医科大学出版社,7～9
Ingber DE.2002.Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology.Circ Res,91(10):877

撰稿人：石学敏 王 平
天津中医药大学第一附属医院

基于临床的经络现象规律及生物学基础

The Law and Biological Basis of the Meridian Phenomena Based on Clinic

两千多年前，中国诞生了第一部医学巨著——《黄帝内经》，在这部典籍中，一个重要的概念贯穿全书，那就是经络（图 1）。经络“内属于腑脏，外络于肢节”，“决生死，处百病，调虚实，不可不通”，是“人之所以生，病之所以成，人之所以治，病之所以起”的关键，一直有效地指导着中医临床各科的医疗实践。



图 1　手太阴肺经经脉循行图

经络理论是中医基础理论的核心。由于经络理论对人体功能调节的许多重要描述与现代医学的概念有较大的分歧，涉及人体功能调节机制这一根本性的问题，因而多年来始终受到国内外学者的深切关注。经络理论的特点是以整体和系

统的观点看待人的生命活动，强调人体各部分之间的相互联系，及其与外部自然环境的统一平衡，对人体的功能调节有许多精辟的见解。中医古典医籍中所描述的十四经脉的特殊循行路线和经络调节的许多规律，尽管早已被中医临床反复证实，但对现代生命科学来说，仍然还是一个尚未被认识的新天地。由于历史的缘故，中医典籍记载的经络理论带有明显的经验色彩，它包括了许多现代科学已经认识清楚的生理与病理规律（如针刺镇痛机制），但也包括了现代科学尚未认识到的一些现象和规律，并在一定程度上带有理论的超前性。在医学科学发展日新月异的今天，人们尚不能明确解释基于复杂人体系统上的诸多经络现象。

所谓经络现象是指机体由于某种原因引起的、沿古典经脉循行路线出现的各种生理病理现象，包括循经感传、循经皮肤病（图2）、循经性神经血管反应、循经感觉障碍或皮肤显痕等现象，现代科学已经用多种指标检测和显示了经络的循行路线，肯定了经络现象的存在，证明了经络现象是普遍存在于人群之中的正常生命现象。

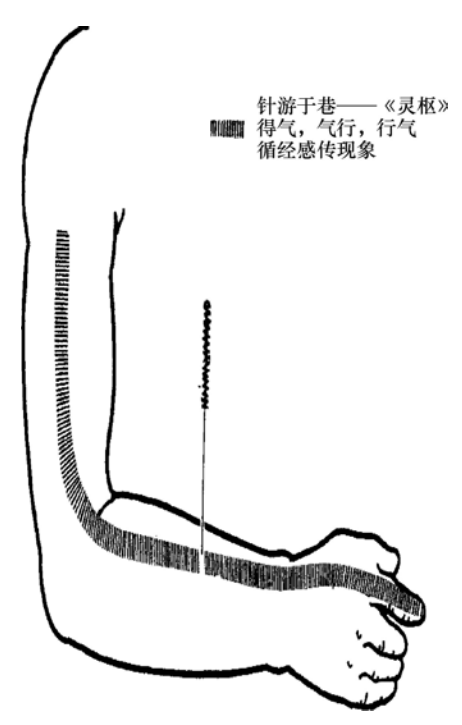


图2　最常见的经络现象——循经感传

在“肯定现象，掌握规律，提高疗效，阐明本质”这样经络研究完整的思路指引下，经脉现象的研究已经取得了许多进展，如坚持临床研究与基础研究相结合、功能与结构相统一、分析与综合相结合的原则。一方面要重视临床和人体上

的经络研究，从临床常见的经络现象入手，研究经络现象的规律，提高临床疗效，进而阐明其本质；另一方面要以系统生物学理念为指导，从细胞分子水平，乃至更深的层次系统阐明经络现象的物质基础；虽然经络现象的研究取得了许多进展，但基于临床的经络现象相关的规律及其功能基础的研究尚存在很多难点问题，主要包括以下几点：

1. 基于临床的经络“处百病，调虚实”治疗作用的规律及其科学机制

经络作为人体的一个调控系统，起到调整人体状态的作用。近来发现，在穴位处有大量可释放的、可调控的物质。在正常生理状态下该物质的平衡调控有一定限度，当人体远离平衡时，经络自身调控能力就不能将机体调整到平衡态，这就需要通过外部干预手段（如针灸）或内部干预调整（如气功）等来促使机体恢复到平衡状态。人体是一个动态平衡的复杂巨系统，中医疾病的概念就是这个系统偏离了平衡。因此要了解经络的“调虚实”进而“处百病”的机制，必须了解这个系统。当人体处于疾病状态时，经络自身的调节功能可能难以为继，针灸是调整经络平衡的一个行之有效的方法。针灸对人体经络系统的非平衡态的调整机制研究，不仅可以解释针灸临床治疗疾病的机制，而且可以帮助我们进一步了解经络受外界刺激下的反应。在中药药性中有“药物归经”这一特性，中药在人体中的作用不同于单一成分单一作用靶点的西药，它可能通过经络系统来调整人体虚实与平衡，进而达到治病效果。中药归经的科学含义研究不仅可以进一步帮我们了解经络调整机制，更重要的是可以阐述中药在人体中的作用机制，为中药治病的中医学基础研究奠定科学的理论基石。

2. 基于临床的经络“内属于腑脏，外络于肢节”联系作用的科学机制

经脉现象中的循经感传现象、经穴-脏腑相关现象等都在一定程度上反映了经络“内属于腑脏，外络于肢节”的联系作用。

这种联系中包括了现代医学已知的许多功能，如神经系统、血液循环系统和内分泌系统。

但由于古人认识这个联络系统并不是以生理学、解剖学和组织学为基础，而是从临床实践中总结概括而来的具有一定规律性的现象描述。因此，对这些联系的描述往往是整体性和功能性的，很难用现在单一系统甚至单一解剖学事实来解释或阐述。过去几十年中对这方面的研究主要是循经感传现象和经穴-脏腑相关等经络现象的客观观察，而以后的研究主要集中在这些现象的机制与本质的研究上，并以此结合现代医学与生理学等知识，期望完整阐述经络“内属于脏腑，外络于肢节”的科学机制。

3. 经络作为“行血气而营阴阳”生理作用的科学机制

在中医学中，“气”所参与表达的不同概念之多是绝无仅有的。然而经络作为气血运行通道，在人体起到营阴阳调虚实的作用，因此要从中医层面完全揭示

经络实质不可避免地要解决“气”这个非常困难的问题。

参考文献

丁光宏，魏瑚．2005．关于将经络研究列入国家重要支持方向的建议．世界科学技术——中医药现代化，7(5)：118～121

张维波，郭义，林玉英，等．2005．经络研究近50年回顾与今后研究方向．世界科学技术——中医药现代化，7(5)：99～103

撰稿人：石学敏[1]　郭　义[2]

1 天津中医药大学第一附属医院

2 天津中医药大学

针刺手法的作用原理

The Mechanism of Acupuncture Manipulation

针刺手法学是针灸理论的重要组成部分，是针灸学科基础理论和临证实践的高度统一，也是实现针刺效应的重要环节和关键影响因素。针灸医学在实践中不断发展和创新，形成了各具特色的手法理论及操作体系。那么，针刺手法是通过何种机制或途径作用于人体而产生效应？不同手法是否有效应相关的、共性的生物学基础？即针刺手法的作用原理，是针灸学科重大的、尚未解决的关键科学难题。针灸学如何与国际接轨，提升其科学内涵，提高针刺研究的水平和科学性，与时俱进地展现其先进性，进而最终提高临床疗效，都迫切需要阐明针刺手法的作用原理。

针刺手法作用原理，包括针刺手法规范标准化，针刺手法效应、规律及生物学基础。

针刺治病的过程就是在明辨虚实、确定选穴的基础上运用各种手法予以补泻，以达到补虚泻实、调整阴阳的治疗目的。针刺手法效应规律的核心科学问题就是“针刺手法的量-效关系”。

由于各种针刺手法从性质上讲，均属于机械性刺激，所以在操作中必然存在着共性的、可遵循的普遍规律，“针刺手法量学”，就是通过大量临床观察、基础研究以及现代科学方法手段的应用而构建的理论体系，并进而凝练出“针刺手法四大要素”的核心问题。“针刺手法量化”实现了针刺操作的统一、规范及标准化，为进一步研究针刺手法效应的普遍规律奠定了基础，为针灸试验进行循证医学原则下的多中心、大样本的临床研究提供了可能，也为针刺手法机制的研究提供了先决条件。同时，工程学、传感器及数字模拟技术的发展和应用，为实时采集针刺手法参数，并通过计算机实现针刺手法数据处理和存贮，提供了技术支持，使我们可以通过现代科学技术，细化针刺过程中特有的参数变化，并以此对各种手法归类、总结及合理深化，构建符合人体组织结构的手法量化模型，进而分析研究针刺手法的效应和生物学基础，最终明确针刺手法的基本原理。

大量临床及基础实验证明，虽然不同手法有着不同的效应，但遵循着普遍的量-效关系（规律）。针刺穴位后，其效应的产生是一个动态的过程，针刺刺激量与针刺效应密切相关，即存在产生最佳效应的最佳刺激量。而针刺效应的作用时间是有限度的，超过某一时间限度针灸效应会逐渐下降直至消失。针刺作用的

时-效量-效关系受到多种因素的影响和制约。针刺手法作用原理首先要明确针刺的效应，以及其量-效、时-效关系。

目前对针刺手法的研究存在诸多问题，严密的定性定量的实验分析工作较少。因此，应用科学的评价手段，研究不同针刺操作手法的客观效应及其作用机制，阐明其合理内涵，对于针灸学科学有序的发展具有重要的意义。

针刺手法是在针灸理论指导下的、操作性极强的应用技术，是在不断的治疗实践中形成和发展的，所以针刺手法研究必须基于临床疗效，以疾病为载体。那么如何从疾病的特异性效应指标中，提炼出反映针刺手法作用机制的共性指征，是一个重大科学理论问题。

针刺手法临床研究病种范围的逐渐扩大，为手法机制研究提供了坚实的平台，对数十个针灸优势病种的针刺手法量-效关系研究发现，针刺手法的效应机制有着共性的生物学基础。而近年来，红外热像仪、膜片钳技术、分子生物学、肌电生理学、神经电生理学、生物工程学、机械力学及功能性成像特别是分子影像学等学科的介入，为从多层次、多角度探讨针刺手法的作用原理及信息传导规律等方面进行深入研究提供了条件。以疾病为载体，以能反映疾病病理机转的特异性效应作为针刺效应的评价指标，同时从不同疾病的研究中提炼能反映针刺手法作用机制的共性指征，通过统计学、数理分析等科学研究方法，进行相关性分析，同时用现代试验手段，明确针刺手法的基本原理，是今后研究的重要方向。

参考文献

卞金玲，张春红. 2003. 石学敏院士针刺手法量学的概念及核心. 中国针灸，23(5)：27～289

胡国强，石学敏. 1992. "醒脑开窍法"治疗中风手法量学的基础研究. 中国针灸，12(2)：33

闵友江，严振国，杨华元，等. 2008. 针刺效应影响因素的定性定量化实验研究. 辽宁中医杂志，35(12)：1923～1927

王立存，郭家奎，林翠茹. 2009. 腧穴特异性与针刺手法对临床疗效的影响. 辽宁中医杂志，36(1)：109～110

袁宜勤，海月明，顾星，等. 2002. 针刺手法规范化的初步研究. 中医药学刊，20(2)：230～232

张海翔，杨光，徐丽，等. 2003. 量化针刺手法对急性闭角型青光眼F值的影响. 中国针灸，23(8)：439～441

撰稿人：石学敏　申鹏飞

天津中医药大学第一附属医院

经穴脏腑相关的规律及生物学基础

Regularity and Biological Basis of Correlativity Between Meridian Points and Viscera

经穴脏腑相关是经络理论的核心，是中医针灸经络理论现代语言表述的核心内容，体现了在中医整体观念指导下医学模式的联系途径。经穴脏腑相关的理论是世界上最早提出的躯体内脏反射（somato-visceral reflex）理论。针灸通过刺激穴位提高机体免疫功能、对脏器功能的双相调节作用，已经得到医学界的公认，而指导针灸临床实践的经穴脏腑相关理论，是中医经络学说的核心内容，其大体上归纳为三个方面：一是经脉与相关脏腑在生理功能上有密切关系；二是脏腑病理变化在经穴上有反应，可以通过这种反应而推断出内脏疾病；三是经脉上的理化刺激对相应脏腑功能有调节作用，这是针灸治疗疾病的核心，也是沟通经络和临床的纽带。但目前对经穴脏腑相关的生物学内在机制一直尚未有明确的认识，是当今医学研究未解决的科学难题之一。

经穴脏腑相关效应规律表现为经穴功能与脏腑效应的特异性，指经穴与非经穴之间作用存在差异，不同经穴之间在功能作用上也存在差异，即某些经（穴）对某脏病或某系统疾病具有明显疗效；其具体体现在单穴对单一脏器的影响、一经（穴）调控多脏（一穴多脏）、多经（穴）司控一脏（多穴一脏）以及多经对多脏的交叉调控。目前，国内外主要集中在“一穴多脏”和“多穴一脏”层次进行研究。一经（穴）调控多脏（腑）是指一条经脉在循行路线上与多个脏（腑）、器官密切联系，因此功能上相互影响，可以调控多个脏（腑）、器官的生理功能，治疗多个脏（腑）的各种病证（图 1）。多经（穴）司控同一脏（腑）是指由于多条经脉在循行路线上与同一脏（腑）密切联系，功能上相互影响，可以调控同一脏（腑）的生理功能，治疗同一脏（腑）的各种病证，但各条经脉对同一脏腑的作用效应有差异（图 2）。

经穴脏腑相关的生物学基础，可能是基于针刺循经效应信息通过神经轴突反射和某些化学物质在特定的环境中传递；针刺作用于穴位后，针刺的物理刺激可激活外周神经末梢或各种针感感受器而形成发生器电位和不同类型编码的神经传入冲动。这种信息可迅速地通过神经反射发挥效应，与针灸的即时效应相关；另一方面，经穴受刺激后其局部组织细胞损伤产生的化学物质（包括 K^+、H^+、组胺、P 物质、乙酰胆碱、5-羟色胺和缓激肽、前列腺素等）可引起一系列反应，

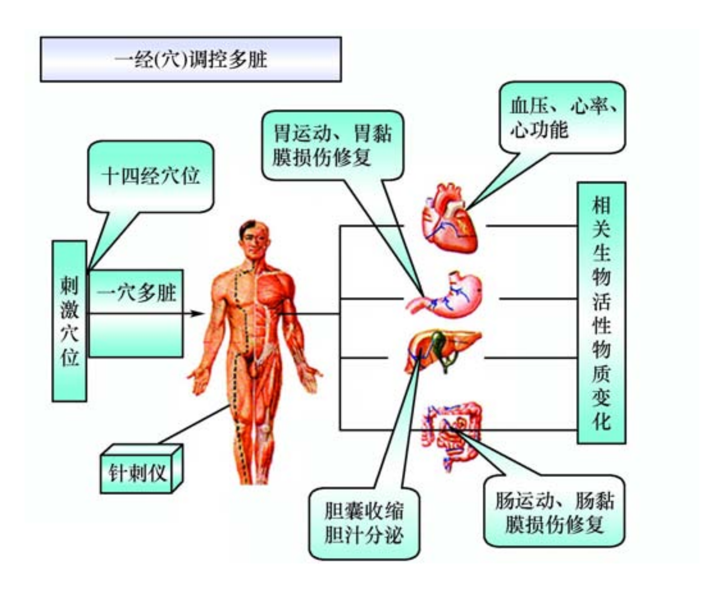


图1　足阳明经调节心、胃、胆、肠功能

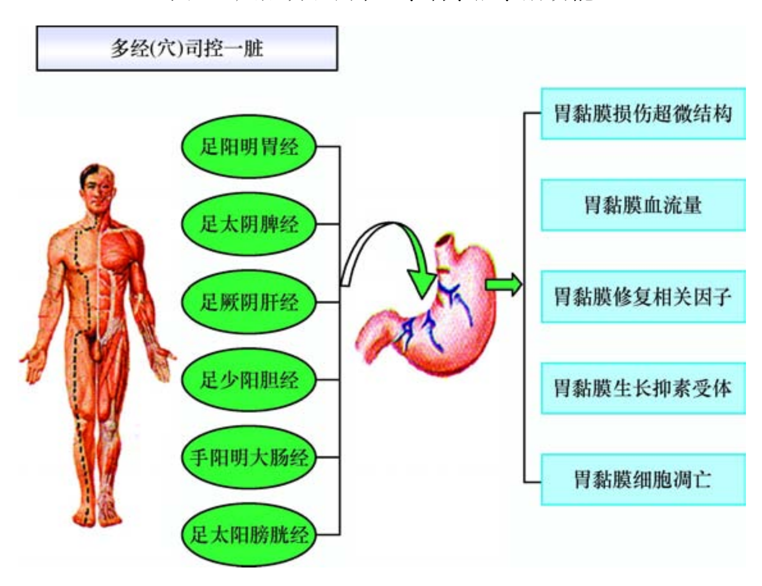


图2　胃经、脾经、肝经、胆经、大肠经及膀胱经对胃的调控

通过与相应的受体结合，介导外周跨节段的信号传递，这与针灸的后效应相关。这些化学物质释放后可作用于外周轴突末梢，形成刺激，不仅引起感觉神经末梢向中枢的冲动传递，也可刺激肥大细胞释放组胺，引起血管扩张，血浆外渗，新陈代谢加快；同时，经轴突反射在轴突分支末梢释放P物质，P物质诱发邻近的肥大细胞释放组胺等化学介质，这些化学介质在组织中扩散一定距离后作用于下

一个神经末梢，引起新的神经兴奋，形成新的轴突反射和化学物质的释放与扩散。循经的信号不断传入中枢形成了循经感传，化学介质对外周组织的作用如扩张血管、使血浆渗出，形成其外周效应。这些理论在一定程度上加深了对经穴脏腑相关的认识，但经络是具有物质、能量和信号转导与传输功能的复杂系统，除了要重视对其物质基础结构的研究，对经络能量传输、经络信号转导的具体机制有待于进一步阐明（图 3）。

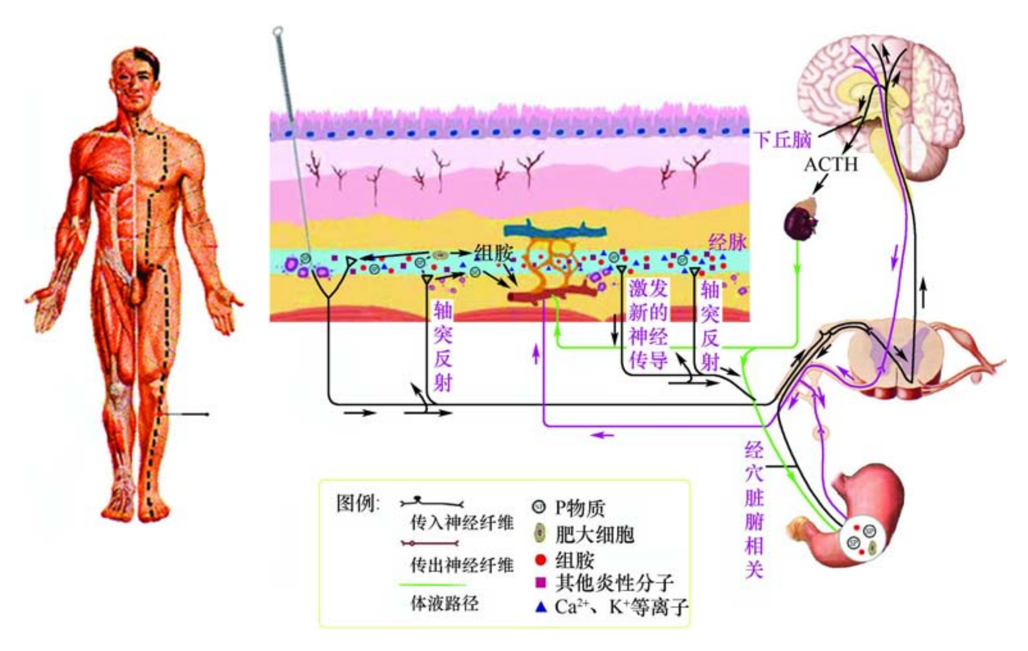


图 3　经穴脏腑相关的生物学基础

经穴脏腑相关及其机制的研究，为临床针灸有效治疗内脏疾病提供了科学证据，其研究意义在于针刺体表穴位这种物理刺激可激发机体内部内在的抗病潜能，激活或调节从外周到中枢各个环节，激活神经-内分泌-免疫网络，从器官、系统到细胞、受体、细胞核、基因、蛋白质分子等不同层次，纠正病理紊乱，从而缓解或治愈疾病，进而揭示人体生命活动自身调节的本质、规律和巨大的潜在能力。这对于揭示现代医学躯体内脏反射、内脏躯体反射理论的机制，提供了大量的科学依据。

但是，目前关于经穴对内脏活动调整作用的研究中还存在诸多问题。第一，如何从现代医学的角度去解释同神经节段经穴或相邻仅仅数毫米或厘米的非穴位点针刺效应的显著差异。随着“穴位活动论”的提出，应加强对经穴、非经穴区神经末梢（感受器）、纤维、神经干、血管等的分布差异的研究，同时加强对内脏疾病在体表反应点、压痛点或触发点或牵涉区的规律性、出现率的系统研究，

加大对疾病状态下针刺阳性反应点（阿是穴）所产生效应机制的系统研究。第二，神经-内分泌-免疫网络是机体调节密切相关、不可分割的组成部分，有必要从免疫网络的角度，进一步加强经穴脏腑相关机制研究的深度和系统性。第三，目前从基因组学、蛋白质组学入手的研究所得到的资料对于说明经穴作用的特异性还有待进一步验证。对于已知的特定基因、蛋白质参与经穴脏腑相关的研究工作还需进一步加强，特别是对细胞内大量的基因和蛋白分子信号转导通路在经穴脏腑相关联系中的作用和相互联系规律，还需要利用系统生物学的技术和方法做大量的相关分析研究。

参 考 文 献

郭义，李桂华，李桂兰，等.2009.脏腑-经穴相关机制的生化研究进展.天津中医药，26(2):169～171

刘俊岭，王俊英，陈淑萍，等.2009.经穴/经脉脏腑相关及其机制研究的进展.中国针灸学会经络分会第十届学术会议论文集，17～21

沈菁，严洁.2008.经脉(穴)与脏腑相关效应规律的研究进展.湖南中医药大学学报，28(1):76～80

喻晓春，朱兵，高俊虹，等.2007.穴位动态过程的科学基础.中医杂志，48(11):971～973

赵晏，孙启新，张世红，等.2002.多种神经递质参与外周跨节段信息传递.针刺研究，27(4):398～302

周逸平.1999.经脉-脏腑相关是经络理论的核心.针刺研究，24(3):238～240

周逸平，汪克明，胡玲，等.2009.经脉脏腑相关研究展望.安徽中医学院学报，28(5):1～4

Yan J，Yang RD，He JF，et al.2005.Effect of acupuncture at different meridian acupoints on changes of related factors for rabbit gastric mucosal injury.World J Gastroenterol，11(41):6472～6476

Zhang S H，Sun Q X，Seltzer Ze'ev，et al.2008.Paracrine-like excitation of low-threshold mechanoceptive C-fibers innervating rat hairy skin is mediated by substance P via NK-1 receptors.Brain Research Bulletin，75:138～145

撰稿人：常小荣
湖南中医药大学

针灸治病的作用原理

Mechanism of Acupuncture Treatment

针灸学作为中医学科体系中具有特色和优势的学科，数千年来为中华民族的繁衍昌盛做出了巨大贡献。目前已有160多个国家承认和运用针灸，世界卫生组织（WHO）也对针灸的有效性、安全性给予了充分肯定。在肯定针灸治疗疾病有效的基础上，探索针灸治病的作用原理不仅是回答针灸为什么能够治病的重要问题，而且也是当今传统的针灸学走向世界，获得国际科学界认可的重要问题。

传统针灸学的观点认为，针灸治病的作用原理是“通其经脉，调其血气，营其逆顺出入之会”（《灵枢·九针十二原》）及“疏通经络、扶正祛邪、调和阴阳”等。但至近代，对针灸治病原理的阐释更多地融合了现代科学的知识。1755年，维也纳学者斯维腾指出针灸作用似与神经刺激之间有某些奇妙联系；1912年，日本三浦谨之助用家兔进行针刺实验，证明针刺有抑制肠蠕动、降低运动神经兴奋性、收缩血管及减慢血流等作用；1934年，中国罗兆琚以“针灸生理作用学说”试图解释针灸作用原理；1997年，美国国立卫生研究院（NIH）召开针灸听证会后指出，针刺可以促进阿片肽的释放；针刺可以激活下丘脑、垂体活动；针刺也可调节血流和免疫功能。迄今为止，研究结果基本表明：①针灸治病的原理与药物不同。针灸不是给予机体补充具体的治疗物质，而主要是一种调整。传统的观点认为，针灸治病是通过对经络腧穴、脏腑、气血的功能调整从而发挥治疗作用；但现代的观点认为，针灸治病是通过神经、体液调节等途径，对异常升高或降低的机体功能进行调整，或者是激发机体的潜在能力（促进可塑性、促进神经发生等）等，从而产生治疗作用。②传统的观点认为，针灸治病的作用途径主要通过经穴配伍、操作手法、补泻原则的合理运用从而达到“疏通经络、扶正祛邪、调和阴阳”的目的。现代的观点认为，针灸治病的作用原理涉及多途径（穴位局部、脊髓、脑、病灶）、多水平（整体、系统、器官、组织、细胞、分子等）、多靶点（神经免疫网络、基因网络、蛋白网络、代谢网络、脑功能网络等）参与。其中，穴位局部各种感受器及受体的激活、不同种类神经纤维的兴奋、肥大细胞脱颗粒、结缔组织的生物力学传导等，构成了针灸治病原理的第一环节；脊髓神经元的兴奋及对穴位信号的初级整合和传出，形成针灸治病原理的第二环节；大脑各部位（下丘脑、脑干、皮质等）对脊髓上传信号的高级整合与传出，成为针灸治病原理的第三环节。

虽然针灸治病的作用原理研究已经取得一些进展，但仍存在一些亟待解决的难题。第一，针灸源于中国传统医学，其治病的作用原理应该用传统医学的理念、观点去向世人阐释还是应该用现代科学知识去阐释或者二者的结合。第二，如果运用中国传统医学的观点去阐释针灸治病原理，如何做到传统医学各种特有的解释（疏通经络、扶正祛邪、调和阴阳等）能够被现代人所理解、认同？第三，如果运用现代科学知识去阐释，如何在现代科学技术对针灸作用原理阐释的基础上实现传统针灸理论的回归与融合？第四，针灸治病本身的复杂性（刺激方式、刺激部位、刺激参数；因人、因时、因地制宜的差异等）和机体响应的复杂性（多途径、多水平、多靶点响应），也是制约针灸治病原理全面阐释的重要难点。虽然目前已经有复杂科学、系统生物学的研究理念和研究手段的出现，但能否引入以及如何合理引入针灸治病原理的研究还需要深入研究和探索。第五，由于针灸治病范围较广，针灸对不同病症的治疗其作用原理的共同性和差异如何，也是值得研究的难点。第六，目前针灸治病的作用原理研究结论主要来自于动物实验，动物的经络、腧穴以及动物实验中的针灸刺激如何与人体及针灸临床吻合，是制约针灸治病原理研究结论向针灸临床靠拢的难题。第七，虽然已经有功能磁共振等无创性研究工具与针灸人体机制研究的结合，但如何解析针灸治病原理的各种成分（针灸材料的作用、穴位的作用、针灸刺激的作用、心理作用等）及不同成分在针灸治病作用原理中的比重，也是值得深入研究的关键问题。

参考文献

Chae Y，Park HJ，Hahm DH，et al. 2006. Individual differences of acupuncture analgesia in humans using cDNA microarray. J Physiol Sci，56(6)：425～431

Goldman N，Chen M，Fujita T，et al. 2010. Adenosine A1 receptors mediate local anti-nociceptive effects of acupuncture. Nat Neurosci，13(7)：883～888

Hui KK，Marina O，Claunch JD，et al. 2009. Acupuncture mobilizes the brain's default mode and its anti-correlated network in healthy subjects. Brain Res，1287：84～103

Hwang IK，Chung JY，Yoo DY，et al. 2010. Comparing the effects of acupuncture and electroacupuncture at Zusanli and Baihui on cell proliferation and neuroblast differentiation in the rat hippocampus. J Vet Med Sci，72(3)：279～284

Langevin HM，Churchill DL，Wu J，et al. 2002. Evidence of connective tissue involvement in acupuncture. FASEB J，16(8)：872～874

Shen J. 2001. Research on the neurophysiological mechanisms of acupuncture：review of selected studies and methodological issues. J Altern Complement Med，7(Suppl 1)：121～127

Wu Q，Zhang Q，Sun B，et al. 2010. ^{1}H NMR-based metabonomic study on the metabolic changes in the plasma of patients with functional dyspepsia and the effect of acupuncture. Pharm Bi-

omed Anal,51(3):698～704
Xing GG,Liu FY,Qu XX,et al.2007.Long-term synaptic plasticity in the spinal dorsal horn and its modulation by electroacupuncture in rats with neuropathic pain.Exp Neurol,208(2):323～332
Zhang D,Ding G,Shen X,et al.2008.Role of mast cells in acupuncture effect: a pilot study.Explore (NY),4(3):170～177

撰稿人：梁繁荣
成都中医药大学

针灸效应的规律及机制

Law and Mechanism of Acupuncture's Effectiveness

作为中医学领域最具有特色和优势的针灸疗法，目前已传播至全世界160多个国家和地区。在针灸学不断向国际化迈进的同时，针灸效应也在不断地被阐明和拓展。传统针灸学领域，针灸效应主要包括疏通经络、调和阴阳、扶正祛邪，或者结合中医理论的醒脑开窍、活血化瘀、安神镇静、健脾益胃、镇肝息风、补益肝肾、调肝理脾等效应；但现代针灸学认为，针灸效应主要有对症效应（镇痛、镇静、止咳、平喘、降压、降糖、降脂、减肥等）、整体功能调整效应（对神经系统、消化系统、呼吸系统、心血管系统、免疫系统等的整体调整效应），以及根据针灸效应出现的时间分类的即时效应、后效应等。

在针灸效应不断得到明确的基础上，需要进一步明白针灸效应的规律是什么？对针灸效应规律的探索，已经成为进一步科学认识、广泛推广针灸疗法的重要思路。目前的研究主要从文献、临床、实验三个方面进行针灸效应规律的寻找和探索。一是结合计算机数据挖掘技术，从古代、现代的针灸文献中进行针灸效应规律发掘。比如，有研究者从偏头痛、功能性消化不良等疾病入手，挖掘出了针灸治疗偏头痛镇痛效应、针灸治疗功能性消化不良的胃肠调节效应的选经用穴规律。二是借鉴现代临床研究方法中的随机对照试验（RCT）方法，前瞻性地设计、探索各种针灸效应产生的选经用穴、穴位配伍、刺激参数，以及时-效、量-效等规律。三是借助动物实验方法开展各种针灸效应的规律研究。在一系列的研究成果中，以针刺镇痛效应规律尤为突出。已有的研究成果表明，针刺镇痛效应规律表现为：①针刺镇痛效应的性质。针刺既能镇急性痛，又能镇慢性痛；既能抑制体表痛，又能减轻乃至消除深部痛和牵涉痛；既能提高痛阈和耐痛阈，又能减少疼痛的情绪反应；既能减低痛觉分辨率，又能提高报痛标准。②针刺镇痛效应的强度。在适宜的针刺刺激条件下，针刺可使正常人痛阈和耐痛阈提高65%～180%。③针刺镇痛效应的空间作用范围。针刺具有全身性的镇痛作用，但穴位与针刺镇痛部位之间有相对的特异性。④针刺镇痛效应的时程。在人体从针刺开始至痛阈或耐痛阈升高至最大值一般需20～40分钟，继续运针或通电刺激可使镇痛作用持续保持在较高水平上，

停针后其痛阈呈指数曲线形式恢复，半衰期为16分钟左右。在目前的研究中，虽然取得了一系列成果，但全面把握针灸效应的规律仍然存在诸多难点。第一，文献发掘方面：由于古今文献众多，病名、病种描述不一，理论认识也存在差异，这些都成为如何从已知文献中科学、有效的挖掘到有用的针灸效应规律的难点之一。第二，临床研究方面：临床研究是探索针灸效应未知规律的重要方法。但由于针灸临床研究设计本身上存在的对照组设置、盲法实施、针灸操作规范等问题尚未彻底解决，这也是影响针灸效应未知规律探索的棘手问题。第三，实验研究方面：动物实验中各种研究结果与针灸临床效应的差距，仍需要通过不断努力来缩小，以能将动物实验中获得的针灸效应规律最大限度地与针灸临床相结合。

除了发掘针灸效应规律，探索针灸效应的机制也一直是针灸研究的重心。目前研究发现，针灸的治疗效应虽然繁多，但其基本的机制可概括为：针灸效应的产生是针灸等各种方法对经络、腧穴刺激后，促进机体神经、体液的调节参与实现。在其具体的研究思路中，国外主要是选择经临床随机对照试验证实有效的病症（如镇痛、止吐等），以分子生物学、生物力学、功能神经影像学等为主切入，强调有效病症，突出先进技术，淡化针灸理论本身，其研究结论简单化，易于被多学科研究学者接受；国内的研究思路更多地强调传统针灸理论（经络、腧穴、手法等）与现代研究方法技术的结合，虽然取得了一些研究结果，但由于传统针灸理论的晦涩难懂和与现代学科知识的融合存在一定距离，针灸效应的机制研究结论难以被广泛接受。因此，针灸效应的机制研究难点主要在于如何合理引入先进、前沿的研究技术开展传统的针灸理论研究，而且，需要最终的研究结论既保持传统，又突出先进，切实推动针灸学科的发展。

参考文献

任玉兰，赵凌，陈勤，等. 2010. 数据挖掘技术在经穴选用及其特异性研究中的应用. 中医杂志，51(1)：47～51

余曙光，郭义. 2009. 实验针灸学. 上海：上海科学技术出版社

Dhond RP, Kettner N, Napadow V. 2007. Neuroimaging acupuncture effects in the human brain. J Altern Complement Med, 13(6): 603～616

Feng Y, Johansson J, Shao R, et al. 2009. Hypothalamic neuroendocrine functions in rats with dihydrotestosterone-induced polycystic ovary syndrome: effects of low-frequency electro-acupuncture. PLoS One, 4(8): 6638

Goldman N, Chen M, Fujita T, et al. 2010. Adenosine A1 receptors mediate local anti-nociceptive effects of acupuncture. Nat Neurosci, 13(7): 883～888

Kong J, Kaptchuk TJ, Polich G, et al. 2009. An fMRI study on the interaction and dissociation between expectation of pain relief and acupuncture treatment. Neuroimage, 47(3): 1066～1076

Langevin HM, Churchill DL, Wu J, et al. 2002. Evidence of connective tissue involvement in acupuncture. FASEB J, 16(8): 872～874

撰稿人：唐　勇
成都中医药大学

藏药“佐塔”减毒增效原理

The Principle of Attenuated Synergistic of Tibetan Zota

如何对含有水银、铅、锡等有毒药物成分的藏药“佐塔”减毒增效原理进行阐释，并规范与优化其制作流程，是开发有毒民族新药的代表性问题。

“佐塔”，是藏语“仁青欧曲佐珠钦木”的简称，意为“煮炼之灰”，它是以有毒的水银为底料，附加金、银、铜、铁、铅、锡等多种金属及其矿石、硫黄等物质，用人和动物的代谢废物（人尿和黄牛尿）作为引子，经过洗、涤、煮、煅烧等极为严格而复杂的炮制工艺而制成的粉末状药物，被誉为“甘露精王”。研究证实“佐塔”具有延年益寿、防毒、排毒解毒、疏通脉络、延缓衰老、祛病延年的功效。

由于“佐塔”的制作复杂，剂量控制困难，再者价格昂贵，所以一般不单独使用，而是作为许多药物的基础成分，如“七十味珍珠丸”、“仁青常觉”、“仁青芒觉”、“二十五味松石丸”等名贵藏药的主要原料。虽然在这些藏药的组方中“佐塔”作为主要组成成分，但其在各方中的比例又有较大不同，如七十味珍珠丸中佐塔占 5.81%；仁青芒觉中占 4.48%；二十五味松石丸中为 2.89%；二十五味珊瑚丸中为 1.63% 等。这些佐塔系列药品已证实具有安神、镇静、通经活络、醒脑、开窍、清热解毒、治疖疗疮等功效，是治疗心脑疾病、各种中毒症、结缔组织病和梅毒等疑难病症的特效药品。

传统“佐塔”的炼制方法即“水银洗炼”（藏语称之为“佐珠钦莫”）法，在古代藏族药物化学研究和实践的工艺中最具特色。传统的制作有三大步骤：能缚八铁煅灰的制作（图 1），能蚀八物煅灰的制作（图 2）和水银洗炼（图 3）因为藏族历代名医可以通过此方法将含有剧毒的水银经过复杂的特殊加工炮制后，炼制成无毒而具有奇特疗效的药中之王“佐塔”，因此藏族人民把“佐珠钦莫”称之为藏药炼制的宝中宝，1988 年，西藏自治区藏医院提出了“药用水银粉末（佐太）的加工方法”的发明专利申请，并获批准。现在“佐塔”的制作方法已正式成为中国首批“非物质文化遗产”。

在藏药“佐塔”的药化研究方面，阎立峰等最近的研究发现，“佐塔”的主要组成元素有 Hg、S、O 和 C，少量的 Fe、Mg、Ca、K、Si、Se、Cu、Al、Ni、Cl、N 和 Na 等；X 射线衍射分析发现“佐塔”中以结晶的形式存在的有六面和立方体 HgS、单质 C、Fe_2O_3、FeC 及少量（S_4N_3）Cl，杨宝寿等应用 X 射

线衍射法和原子吸收法对“佐塔”化学成分和汞含量进行了分析，结果表明样品中汞含量为 317.4mg/g，硫化汞和单质硫的含量大于 90%，认为汞在“佐塔”中以硫化汞形式存在。研究还表明：不同地区的“佐塔”样品中汞含量存在差异，建议暂定“佐塔”中硫化汞的含量以汞计≥320mg/g；另外，还可能存在一定量的有机物，尚有待进一步的研究。



图 1　藏药“佐塔”制作工艺一：能缚八铁煅灰，即金、银、铜、铁、响铜、黄铜、锡、铅 8 种金属的煅灰，这种煅灰可以束缚水银的流动性并消敛汞毒



图 2　藏药“佐塔”制作工艺二：能蚀八物煅灰，即金矿石、银矿石、磁铁矿、自然铜、酸石、黑云母、雄黄、雌黄八物，这种煅灰加在水银中可以腐蚀水银锈垢、消蚀汞毒



A

B

图 3 "佐塔"的水银洗炼，包括洗锈过程、煮洗除毒、配以对立物显示水银本色三个过程

在毒理研究方面，郭荣晓等对动物脏器中汞蓄积量的研究发现，"佐塔"中汞较易在肾脏中蓄积，但停药后能较好地排泄，这说明"佐塔"的应用可能比较安全。杨宝寿等以大鼠为实验对象，结果显示"佐塔"长期使用对机体的一般状态、生长发育、血液指标、肝肾功能、重要脏器的组织学结构都无明显影响，提示"佐塔"的安全性较好。索有瑞等对"佐塔"的另一配伍珍宝药品"七十味珍珠丸"进行了毒理学研究，结果表明，在实验选定的给药剂量下，金诃七十味珍珠丸对实验大白鼠的外观、行为、活动、饮食等无不良影响；在人工模拟胃液中

七十味珍珠丸的重金属元素浓度水平显著降低，机体吸收不多，即使吸收到动物体内，大部分重金属也能排出体外，机体内无明显长期蓄积性毒性。综上所述，“佐塔”及其配伍药物中汞的含量虽然较高，但实验研究表明其应用是基本安全的。

尽管藏药“佐塔”的研究取得了一定的进展，但目前仍存在以下难题：第一，尽管传统工艺的理论及部分现代研究表明该药无明显的不良反应，但临床仍缺乏足够的数据证明长期应用的安全性，加之藏药“佐塔”配伍了剧毒的水银、铅、金等金属药物，因此，探讨如何降低藏药“佐塔”的毒性作用是目前的重大难题之一。第二，尽管“佐塔”具有良好的临床疗效，但如何进一步通过配伍药物的筛选，制作工艺的优化来实现增效的目的亦是一个重大难题。

文献梳理和理论研究是深入认识“佐塔”减毒增效原理的重要基础。而“佐塔”减毒增效原理的阐明离不开实验研究，将理论研究与药物化学、药理毒理结合的综合研究将会更清晰地揭示其减毒增效的原理。为此，通过无机质谱-原子发射光谱、X射线衍射、扫描电镜对“佐塔”进行无机成分分析和微结构的观察，通过高效液相色谱对“佐塔”进行有机成分的探索，利用DPPH清除实验、对果蝇寿命影响的实验探索其抗氧化作用，再进一步利用其无机成分和有机成分的DPPH、羟自由基、超氧自由基的清除率比较，证实其抗氧化作用的物质基础。同时，开展符合藏医药理论、具有传统制作工艺效果的“佐塔”毒理实验是实现减毒增效面临基本挑战之一。

参考文献

郭荣晓，松吉娜姆.2003.藏药“佐塔”中所含汞的作用特点和安全性研究.2003全国藏医药学术研讨会论文集，502

久美彭措.1999.藏药中重金属毒性的实验研究.1999全国藏医药学术研讨会交流论文

兰科.1999.简述藏药佐台.中国民族医药杂志，12(5)：86

索朗.2004.佐塔的炮制.中国民族医药杂志，12(5)：40～41

阎立峰.2007.藏药“佐太”的微结构与成分分析.中国藏学，(3)：150～152，174

阎立峰，马小科，朱清时，等.2007.藏药佐台无机成分分析.中国中药杂志，32(2)：159～160

杨宝寿，郭荣晓，江吉村，等.2004.藏药“佐塔”中汞的作用特点和安全性研究.西藏研究，(1)：74～80

撰稿人：崔　箭　庞宗然

中央民族大学

植物寄生类彝药的应用

Application of Yi Chinese Medicines of Parasitic Plant

人类已经迈入21世纪，随着人类生活条件、生存环境的变化，人类身心疾病增加，医学模式已由“生物医学”向“生物-心理-社会医学”转变。医疗模式也由单纯的疾病治疗转变为预防、保健、治疗、康复相结合的模式，各种传统医学和替代医学发挥着越来越大的作用。而且在人类回归自然的浪潮中，天然药物由于不良反应小，越来越受到人们的青睐。民族药物本身就是各族人民在数千年同疾病斗争的过程中，筛选证实其确有疗效而保留下来的。在漫长的历史发展中，彝族医药同其他民族医药一样，是彝族人民在同大自然和疾病作斗争过程中，经过长期反复实践，积累了具有彝族医药特色的传统医药学。

彝医在清浊二气及其气路学说等理论基础上，用药讲究精练、简便、起效快。彝族药物达数千种，包括动物药、植物药和矿物药。一般用1～3味，作煎剂、散剂等，植物药多以鲜品用药，可咀嚼、水煎、外敷等。

寄生类药材在彝药中有较重要的地位。据统计，寄生类药材占彝药总数的2.9%，这种“树上之树”作为药材，大都用在疑难杂症上。目前彝文医药文献记载的共有29种（表1）。

表1　彝文医药文献中记载的植物寄生类药材一览表

药材名称	所载彝文古籍	主要功用
香面树寄生	彝人病痛药方	清热解毒，用于高热不退、红白痢
麻栎树寄生	彝人病痛药方	清热解毒，用于高热不退
花椒树寄生	彝人病痛药方	清热解毒，用于持续发热
花椒树寄生	彝人病痛药方	有除湿止痛、化瘀生新之功效，还可以用于小儿乳糜尿
红山茶树寄生	彝人病痛药方	有止泻止痛之功效，用于腹泻、屙血、腹痛、反酸
青冈树寄生	彝人病痛药方	用于睾丸炎
鸡血藤寄生	彝人病痛药方	活血调经，用于不孕症、月经不调
七里香寄生	聂苏诺期	有清热解毒、祛瘀消肿之功效
牛嗓管树寄生	聂苏诺期	有渗湿利水补脾养心之功效，多用于肺心病
柳树寄生	聂苏诺期	用于喉痛、咽痛、舌尖红、口腔炎

续表

药材名称	所载彝文古籍	主要功用
松树寄生	聂苏诺期	清热解毒、舒筋活血，用于肺结核、不孕症、风湿病
鸡矢藤寄生	聂苏诺期	有健脾理气、消坚化滞、祛风止痛之功效
苦刺花寄生	聂苏诺期	用于肺虚久咳，煎水洗可治滴虫症、阴门瘙痒
石榴花寄生	聂苏诺期	清热解毒、收敛止泻，用于咽喉肿痛、腹泻、口痰过多
芒果树寄生	聂苏诺期	用于治疗水肿
梨树寄生	聂苏诺期	有祛风、强筋、壮骨、除热、润肺、止咳之功效
黑果树寄生	聂苏诺期	多用于病毒引起的疾病
蜜桶花树寄生	聂苏诺期	用于肝炎、骨髓炎、跌打损伤、风湿骨痛
橄榄树寄生	聂苏诺期	多用于膀胱炎等尿路感染疾病
紫柚木寄生	聂苏诺期	有清热解毒、利水渗湿之功效，多用于尿路感染
麻栗树寄生	聂苏诺期	清热解毒、用于风热感冒
地板藤寄生	聂苏诺期	清热解毒、除湿利尿，多用于尿路感染
圆金刚寄生	彝人病痛药方	清热解毒、祛风定惊，多用于抽风、惊厥、昏迷
金刚钻寄生	彝人病痛药方	多用于尿路感染、前列腺疾患
半架牛寄生	彝人病痛药方	清热解毒、除湿利尿，多用于尿路感染
四楞金刚寄生	彝人病痛药方	用于红白痢疾、腹泻、屙血
桃树寄生	彝人病痛药方	有温经暖宫、活血调经之功效，常用于不孕症、附件炎
祭龙树寄生	彝人病痛药方	用于小儿惊风
马缨花树寄生	彝人病痛药方	清热解毒，止血调经，多用于月经不调

我国传统医学在发展过程中，均以朴素的自然观和传统文化为背景，绝大部分药物为天然药物。各民族间相互交融，许多药物为不同民族所共用。多种中药来源于少数民族药物，如藏药冬虫夏草、蒙药蒙古黄芪、维药肉苁蓉，这些都是常用中药材。然而同为桑寄生科植物的桑寄生、槲寄生为传统常用中药，在彝族人民聚居地亦广泛分布，但彝族医药文献里却未见记载，且不被古代和当代彝医习用。彝医习用的寄生类药物亦未被中医药学著作收载。

植物亲缘关系相近，则其所含的化学成分也相同或相近。相对应，其药理作用应类似。但是中医认为桑寄生能补肝肾、强筋骨、除风湿、安胎。彝医习用的寄生类药材大多能清热解毒。因此，研究植物寄生类彝药的作用机制为一难题。

已有学者对寄生类彝药展开现代研究，为阐明其作用机制提供了依据。现代研究证实清热药多具有抗炎、抗肿瘤等药理作用。现有关于桑寄生科药用植物的相关化学成分、药理作用及机制亦可验证。

现以彝药桃树寄生为代表阐述寄生类医药作用机制的研究进展。彝药桃树寄

生（图 1）为桑寄生科钝果寄生属的柳叶钝果寄生 *Taxillus delavayi*（Van Tiegh.）Danser 的寄生全株，又名柳树寄生。彝医药书《聂苏诺期》就有收载桃树寄生，彝医用于治疗不孕症、妇科附件炎等。而桑寄生科在《神农本草经》列为上品，有补肝肾、强筋骨、祛风湿、安胎元功能。《中华人民共和国药典》2005 年版收载的桑寄生为桑寄生科植物桑寄生 *Taxillus chinensis*（DC.）Danser 的干燥带叶茎枝，用于风湿痹痛、腰膝酸软、筋骨无力、崩漏经多、妊娠漏血、胎动不安、高血压等。因此，彝药桃树寄生与中药桑寄生是同一科同一属而不同种植物，它们的功能主治也有所不同。



图 1　桃树寄生

中药桑寄生含有萹蓄苷、槲皮素、槲皮苷、金丝桃苷等黄酮类化合物。《中华人民共和国药典》2005 年版收载的桑寄生就用槲皮素作为对照品进行桑寄生的鉴别实验。黄酮类化合物是一类天然多酚类物质，以游离的苷元或与糖等结合成苷的形式广泛存在于高等植物体内，属植物次级代谢产物，具有广泛的生物活性，包括抗氧化、抗衰老、抗肿瘤、抗菌等。但是，彝药桃树寄生的化学成分及其生物活性方面的研究鲜见，亟待我们利用现代科学方法阐明其物质基础以及药理活性。

桑寄生科植物具有特殊的半寄生性适应特点，寄主通常并不限于某一物种，有时同一桑寄生原植物，其寄主可能会多达数十种，如桑科、山茶科、壳斗科、芸香科、蔷薇科、豆科等。由于寄主不同，寄生体内累积的化学成分可随寄主的变化而发生一定的变化。如寄生在马桑树上的桑寄生科植物，其体内可累积寄主含有治疗精神分裂症的马桑内酯有效成分。寄主分别为夹竹桃、桑树、无患子和桂花的红花桑寄生提取物的体外抑瘤效果差异明显。夹竹桃寄生抑制肿瘤细胞增殖的效果最好，桑树寄生抑制肿瘤细胞增殖的效果次之，无患子寄生又次之，桂花寄生在检测的浓度范围内基本无抑制作用。

因此，由于寄主的多样性，使其含有的化学成分有所不同，从而导致寄生类

药用植物的作用机制的差异。

天然药物成分复杂，从天然药物中寻找具有活性的单体成分是当今世界药物研发的重要途径。如现临床广泛应用的抗肿瘤药物紫杉醇则是从我国特有植物红豆杉中提取。然而根据我国传统医学（包括中医药、民族医药）的用药习惯，入药多为天然药物，且多为复方应用，其药效物质为多成分、多途径、多靶点的综合作用，有着单体成分无法比拟的优势，如不易产生耐药性、不良反应小、来源广泛等。如著名彝药“云南白药”，治疗伤科疾病疗效显著，治愈率高，产品畅销全球，被誉为“伤科圣药”。

综上所述，民族医药是一个伟大的宝库，随着国家对传统医学的扶持力度加大，传统医学尤其是研究基础相对薄弱的民族医药已开始焕发出新的活力。相信在充分发掘整理民族民间的医疗方法和用药经验，坚持在民族医药理论的指导下，充分利用现代科技手段，以提高疗效为核心，对民族药物的种植资源、栽培加工、质量评价、药理作用及作用机制、临床应用等进行系统研究，民族医药一定能够为人类的健康做出更大的贡献。

参考文献

崔箭，唐丽.2007.中国少数民族传统医学概论.北京：中央民族大学出版社，8：15～23
王正坤.2004.彝医揽要.昆明：云南科学技术出版社，107～108
聂鲁，赵永康，等.聂苏诺期.1988.昆明：云南民族出版社，71
国家药典委员会.2005. 中华人民共和国药典(2005年版)·一部，210～211
董政起，朱静，金光株.2007.HPLC指纹图谱鉴别桑寄生和槲寄生吉林中医药，27(2)：56～57

撰稿人：崔　箭　朴香兰
中央民族大学

中药功效的多元性与其效应基础

The Effect Diversity and Corresponding Constituents of TCM

在长期的中医药临床实践中，历代医家为每味中药赋予了特定的药性与功效描述，以便在组方配伍中根据不同病证选择合适的药味。例如，中医认为中药桂枝具有发汗解肌、温经通脉、通阳化气等多种功效。在桂枝汤中桂枝可解肌发表，与芍药配伍，一治卫强，一治营弱，共调营卫；在小建中汤中桂枝温中助阳，合甘温之饴糖辛甘化阳，以建中阳之气；在桃核承气汤中桂枝通行血脉，助桃仁破血祛瘀；在金匮肾气丸中桂枝温通阳气，与附子合用，补肾阳之虚，助气化之复；在苓桂术甘汤中桂枝能够温阳化气，布化津液，并平冲降逆，助茯苓化饮利水。据此表明，在用药过程中，药物所发挥的治疗作用因不同的配伍环境和配伍关系表征出各具特点的治疗效应，药物随所配伍的方剂不同而呈现出不同的效用，客观表达了中药功效具有明显的多元性。徐灵胎在《医学源流论》中早已指出："然一药不止一方用之，他方用之亦效，何也？盖药之功用，不止一端。在此方，则取其此长，在彼方，则取其彼长。"医家认为"方之既成，能使药各全其性，也能使药各失其性，操纵之法，有大权焉，此方之妙也"。

基于现代认识，中药功效多元性的表征除受方剂配伍关系与环境等多种因素影响外，主要是各药味所含多种类型的化学物质及其在规定用量下产生的不同生理病理效应。中药的多元性功效虽然给中医临床治疗带来了极大的便利和灵活性，却也使中药的效应物质基础研究成为了一个科学难题。到目前为止现有的技术手段还难以清晰、有效地将中药的多元功效同其效应物质基础关联起来。一方面中药的化学成分十分复杂，结构类型众多。例如甘草，就目前所知含有黄酮类成分 18 种、萜类成分 22 种、氨基酸类 14 种，以及生物碱类、香豆素类等 60 多种化学成分。

在中医临床实践中，很少会以单味中药治疗疾病，中药的功效表现在不同的方剂配伍中。由多种药味组成的方药其成分的复杂性的清晰阐明是科学难题；这些物质成分群进入体内发生的一系列生物修饰和代谢也是科学难题；在体内外源性物质各成分间的相互作用、外源性物质与内源性物质间的相互作用表现出的药物相互协同、拮抗，甚至既协同又拮抗之复杂关系同样是棘手的科学难题。

中药功效的多元性使得中药物质基础研究缺少明确的效应指向性。按照现代效应物质基础研究的思路，要研究有效成分就必须知道某药物用于某个方剂，该

方是针对什么病的，具有哪些生物活性，而中医方剂的一方多用、复方的加减方以及中医的辨证论治使得传统寻找有效成分的药理学方法有些无能为力。此外，中药多成分、多活性及成分间复杂的相互作用通常会使中药在药理活性评价中表现出温和但广泛的生物活性，缺乏明确的活性指征，甚至成分经过分离纯化后反而会活性下降，使得寻找真正的中药效应物质难度很大，更加难以与中药功效相关联（图 1）。

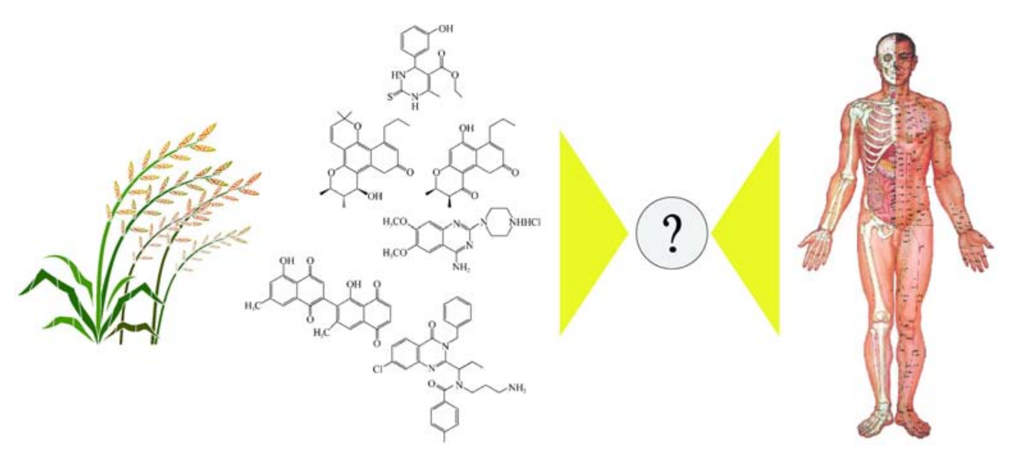


图 1　复杂的中药成分与在人体表征的多元功效相联系

现代研究中，中药功效与其效应物质基础的关联规律越来越受到重视并成为热点问题。首先，这种关联规律对解释中医药独特的治疗作用具有重要的基础作用。了解了这种关联规律，就相当于将复杂的中药成分或多元功效进行了有效的分类归纳，无论对于研究其成分间的相互作用、生物活性及其内在机制还是中药与人体间的关系都具有重要的支持作用。此外，该规律对于确定中药真正的物质基础，获得能够代表中药功效的效应成分群以及准确控制中药材、中药产品的质量，中药新产品开发，获得国际认可都是必不可少的。

尽管中药功效的多元性和效应物质基础的关联规律具有重大的理论和现实意义，现有的研究思路与方法还难以有效建立这种关联关系，需要在效应物质基础研究中不断创新研究思路，应用先进的研究方法和技术实现关联。要科学阐明中药方剂的疗效，必须坚持化学成分研究和药理研究相结合，基本讲清方剂实现其各自功效的物质基础是什么？从药效和作用机制方面说明各效应物质所起的作用。

近年来复杂系统是信息科学与系统理论的一个重要发展方向，以还原论、经验论及“纯科学”为基础的经典科学正逐步吸收系统论、理性论与人文精神，从而促使了复杂性研究的兴起。中药方剂效应物质的多样性、差异性及其自组织

性、整体涌现性等特征，以及方剂内部组成部分间的相互关系、相互作用，方剂与人体之间的动态非线性相互关系和相互作用决定了方剂效应物质是一个复杂系统。因此，借鉴复杂性科学的研究思路与方法，以整体观念为指导，利用现代生物信息学方法和技术，针对中药方剂效应物质与生物效应研究的各组相关数据进行分析、归纳，挖掘复杂效应物质之间、物质与生物效应之间、效应物质与人体作用过程之间的相关规律，有可能在中药多元化功效与效应物质之间建立联系。

参考文献

段金廒，陆茵，陈建伟，等. 2006. 方剂现代研究的思路与方法. 南京中医药大学学报，22(1)：1～4
段金廒，宿树兰，丁安伟，等. 2006. 方剂复杂效应物质的研究思路与方法. 中国药科大学学报，37(增刊)：59～64
姜廷良. 1999. 论中药复方药效物质基础和作用机制研究的意义. 中国中西医结合杂志，19(4)：195～196
陆茵，段金廒，丁安伟，等. 2005. 应用新技术研究方剂药效物质基础的思路和方法. 世界科学技术——中医药现代化，7(6)：19～23
唐于平，段金廒，丁安伟，等. 2007. 中医方剂物质基础现代研究的策略. 世界科学技术——中医药现代化，9(5)：20～24
徐强. 2006. 中药成分在方剂中的作用及其研究思路. 中国天然药物，4(5)：327～331
徐青，肖红斌，梁鑫淼. 2001. 中药复方药效物质基础的研究方法与技术. 世界科学技术——中药现代化，3(4)：25～28

撰稿人：段金廒　尚尔鑫　华永庆
南京中医药大学

道地药材的道地性品质特征及其成因的系统揭示

The Systematical Illumination of Geoherbs Quality Characteristic and Its Formation Mechanism

道地药材是产于特定地域内的，在中医长期临床实践中产生的、公认的优质中药材。这一概念的形成与我国特有的地理、文化背景及中医药理论有关，世界其他民族和国家均未见到“道地药材”的提法。由于分布有很强的地域性，道地性研究在国外基本没有涉及，其现代研究既没有基础，也缺少现成的经验可以借鉴。

中药材的道地性溯源于距今 2000 多年前的《神农本草经》；明代《本草品汇精要》一书中，在每味药专列“地”一项介绍该药产地，强调“道地”，但道地性的内涵却从未见论述。20 世纪末期，道地药材研究引起人们的重视，中国中医科学院中药研究所胡世林研究员出版了《中国道地药材》、《中国道地药材论丛》和《中国道地药材图说》三部专著。其中《中国道地药材》是我国历史上首部道地药材研究的专著，收入道地药材 159 种，包括植物来源 131 种，动物来源 20 种，矿物来源 8 种。全书共分 19 章，该书全面汇总了我国道地药材的总体特征。其他学者也就道地药材形成的动力、道地药材的形成模式展开讨论；人们认识到，遗传因素、环境因素及人为因素的综合作用是道地性形成的原因。近年来，有学者先后就道地药材形成的生物学本质、道地药材形成的模式假说、道地药材属性及研究对策、环境胁迫下次生代谢产物的积累与道地药材的形成、道地药材的分子机制及遗传学本质等问题进行了系统探讨，提出了“道地药材化学组成具有独特的自适应特征；道地性越明显其基因特化越明显；环境胁迫会刺激道地药材的形成”三个道地药材形成的模式理论，并通过受控实验结合生产实践进行应用和验证。相关研究代表了国内道地药材研究的最新进展。

现代生物学认为，道地性是指同种药材在道地产区较其他地区质量佳、疗效好的属性，它是中药研究领域最具中医药内涵的内容之一。道地性是个高度抽象的概念，它反映了药材的综合性状。由于这种综合特性构成及关系复杂，导致道地性特征的内涵不明确，通常无法建立评价指标体系。近年来，人们认识到道地性的本质是种内连续变异，其在化学成分上的特征通常并不是某个化学组分的有或无，而是化学组分含量和配比的变化。总体来看，以道地性特征为基础的道地

药材鉴别及评价既是道地药材的基础，也是难点。

作为特定地理环境的产物，道地性被认为是特定种质长期适应环境的结果。现代生物学认为道地药材是同种异质，是道地药材原物种在其分布产地的种系与区系的发生发展过程中，长期受孕育该物种的历史环境条件影响而形成的某一特殊的居群。道地性的形成受到遗传与环境及其交互作用的影响，其形态数量特征的最终表现形式，是各方面因素综合作用的结果。作为遗传变异和自然选择的结果，道地药材的形成是特定的基因型，在特定的生境下受到复杂的调控，导致某些代谢过程的关键酶基因的表达产生了时空差异的产物。遗传变异和生态环境的交互作用，大大丰富了中药材种质资源，为道地药材品质形成提供了生态生物学基础，但却极大地增加了道地性形成机制研究的难度。

现代分子生物学技术和空间信息分析的飞速发展，为道地性的研究提供了前所未有的机遇。在未来一段时间，如何充分利用分子生物学、生态学、数量遗传学、系统进化学、谱系地理学等相关学科的理论和方法，在广泛调查及大量研究成果分析的基础上，利用现代色谱和光谱技术，结合现代统计学、化学计量学等技术提取道地性质量特征；如何在提出道地药材形成的理论和科学假说的基础上，通过严格的受控实验来揭示道地药材形成的机制成为道地药材研究的核心内容。当前，道地性形成机制研究亟待回答的科学问题包括：遗传与环境如何作用产生了道地药材？二者对药材道地性形成的贡献如何？道地性形成的遗传机制是什么、环境机制是什么？遗传与环境因子的交互作用是如何发生的？这些更深层次的问题尚属于空白。这些问题不解决，就无法阐述道地性的科学内涵。至于如何利用道地药材的遗传机制和环境机制来生产和保护道地药材更是无从谈起。同时，如何认识人为因子对道地性影响，如何利用现代国际社会承认的法律制度来保护道地药材生产中的传统文化等也是一个空白点。

参考文献

郭兰萍，黄璐琦，Christian W Huck. 2009. 道地性现代诠释及道地药材鉴别：近红外光谱技术及其在中药道地性研究中的应用. 中国中药杂志，34(13)：1751～1757

黄璐琦，郭兰萍. 2007. 环境胁迫下次生代谢产物的积累及对道地药材形成的影响. 中国中药杂志，32(4)：277～280

黄璐琦，郭兰萍，华国栋. 2007. 道地药材属性及研究对策. 中国中医药信息杂志，14(2)：44～46

黄璐琦，郭兰萍，胡娟，等. 2008. 中药道地性的分子机制及遗传背景. 中国中药杂志，33(20)：2303～2308

黄璐琦，张瑞贤. 1997. “道地药材”的生物学探讨. 中国药学杂志，9(32)：563～566

胡世林. 1989. 中国道地药材. 哈尔滨：黑龙江科学技术出版社

胡世林.1997.中国道地药材论丛.北京:中医古籍出版社,74
胡世林.1998.中国道地药材原色图说.济南:山东科学技术出版社
肖小河,夏文娟,陈善墉.1995.中国道地药材研究概论.中国中药杂志,20(6):323～328
谢宗万.1990.论道地药材.中医杂志,40(10):43

撰稿人：黄璐琦　郭兰萍
中国中医科学院

转基因药用植物培育研究

Studies on the Cultivation of Transgene Medicinal Plant

药用植物是中药材的主要基源，药用植物资源的特点是有限性和可再生性。药用植物的产量、药用部位中有效成分的含量以及大面积种植过程中植物的抗病性、抗逆性等都是大面积生产过程中必须考虑的因素，更是影响中药材可持续发展的关键科学问题。为此，通过现代生物技术，实现药用植物生产过程的优化是实现中药材资源可持续发展的主要途径，而转基因技术是实现药用植物生产过程参数优化的生物技术之一。

转基因技术始于20世纪80年代。该技术是指利用分子生物学技术，将某些生物的基因转移到其他物种中，改造生物的遗传物质，使遗传物质得到改造的生物在性状、营养和消费品质等方面向人类需要的目标转变。世界上第一种转基因植物是一种含有抗生素药类抗体的烟草（1983年）；世界上第一种转基因食品是在美国市场登陆的转基因晚熟番茄（1993年）。转基因农作物可能同时具有高产、优质、抗病毒、抗虫、抗寒、抗旱、抗涝、抗盐碱、抗除草剂等多重优点。转基因生物技术被称为“人类历史上应用最为迅速的重大技术之一”，发达国家纷纷把发展转基因生物技术作为抢占未来科技制高点、增强农业国际竞争力的战略重点，发展中国家也积极跟进。推进转基因生物技术研究与应用，是我国实施科教兴农、提升科技竞争力的重大发展战略。

药用植物的生产属于农业技术领域，被称为中药农业。利用植物转基因技术，生产转基因药用植物不仅有着广泛的应用前景，也是大势所趋。转基因药用植物是通过重组DNA技术，将来自其他物种与抗逆性、抗病性、有效成分合成等相关基因人工插入某药用植物以创造出拥有新特性的优良药用植物。转基因药用植物可保障中药产业的可持续发展，是解决中医药物质基础的根本途径。

将人工分离和修饰过的基因导入生物体基因组中，由于导入基因的表达，引起生物体性状的可遗传修饰，这一技术称之为转基因技术。转基因技术包括外源基因克隆、表达载体、受体细胞及转基因途径等。

常用的植物转基因方法主要通过组织培养再生植株，包括农杆菌介导转化法、基因枪法；此外尚有不需要通过组织培养的方法，即花粉管通道法。

转基因药用植物培育的难点之一是如何阐明与中药药性相关或与有效成分

相关的功能基因，与药用植物抗病性相关的基因，从而才能有的放矢地开展转基因工作。难点之二是转基因药用植物的可用性与传统中药的药性关系。转基因植物是基因组中含有外源基因的植物，它可通过原生质体融合、细胞重组、遗传物质转移、染色体工程技术获得，改变植物的某些遗传特性，培育高产、优质、抗病毒、抗虫、抗寒、抗旱、抗涝、抗盐碱、抗除草剂等的作物新品种。转基因技术可改变植物的多种与人类健康相关的属性，2008年1月科学家通过转基因改变了一个胡萝卜，其会产生活性钙，具有了治疗骨质疏松症的可能。但对中药材而言，其作用或药性是药用植物化学成分整体信息的反映，转基因药用植物改变了植物的某些遗传特性，有可能改变了来源于转基因药用植物中药材的整体化学属性，改变药性。如何保证所转基因在实现了提高抗病、抗逆及高产特性的同时，达到不失药材的药性或增强药性的目的，从而对基因的筛选提出更高的要求。难点之三是转基因相关成分与中药有效成分的关系。中药的作用特点是多成分输入，整体效应表达。成分与活性靶点的相关性极为复杂，何谓有效成分难以准确界定，多以成分群、组分的形式表达。因此，成分合成的相关基因不是单一的，而是复杂的非线性关系，这给转基因实施带来了较大的挑战，如何认定目的基因也是一个较大的课题。难点之四是如何解决对药用植物的生态危害。转基因药可产生新的病害，产生新的农田杂草、基因流和杂交，影响其他药用植物的生长和繁育。为解决上述难点问题需开展以下几方面的工作：

(1)常用药用植物的基因组研究：对现有药用植物基因组进行研究，阐明与功能成分、植物抗逆性、抗病性等相关的功能基因，为转基因奠定基础。尤其是通过中药或天然药物的主要有效成分及相关功能基因研究，通过转基因强化某种主要成分的表达，强化特殊药性。

(2)对药用植物实施分类管理：对现有药用植物在生物学分类的基础上，结合药性及药效，通过转基因技术对不同药用植物针对性地解决原生植物的薄弱问题。如龙胆主要通过转基因解决抗斑枯病问题，柴胡需解决产量问题，等等。

(3)将转基因与植物次生代谢结合：通过药材活性成分的研究，针对某类成分生合成途径关键酶及相关基因，开展转基因研究，解决大类成分的高表达问题。从而更加体现中药对有效部位、有效组分的组合活性成分要求，体现中药药性特点。

(4)加强中药的基础研究：加强中药有效成分的基础研究，阐明活性及机制，阐明生合成途径及相关基因是转基因药用植物的前提。

参考文献

编辑部.2009.环境生物技术,代谢工程,转基因动植物(导读版).北京:科学出版社

吴英,郭安平,孔华,等.2005.药用植物基因工程研究进展.热带农业科学,25(2):46～52
Key S,Ma JK,Drake PM.2008.Genetically modified plants and human health.JR Soc Med,101(6):290～298
Persons DA,Nienhuis AW.2003.Gene therapy for the hemoglobin disorders.Curr Hematol Rep,2(4):348～355

撰稿人:王喜军
黑龙江中医药大学

重要中药及天然药用生物资源活性成分的生物合成及其关键酶系统

The Biosynthesis of Active Ingredient and Its Key Enzyme System of Important Biological Resources of TCM and Natural Medicine

植物次生代谢产物是中药及天然药用生物资源活性成分的主要来源之一，具有显著的种属、器官、组织及发育时期特异性，并且有瞬时、微量表达的特点，同时其合成还受环境中生物和非生物因素的影响，使植物次生代谢生物合成及其关键酶系统研究成为难点。随着人类疾病谱的改变，医学模式也发生了相应的变化；全球对中药及天然药物资源的需求量不断增加，导致资源的短缺，品质下降。中药品质亟须改良、珍稀濒危植物资源亟须寻求新的资源生产途径、从天然药物资源中“高效”获取药用物质等，都依赖于中药及天然药用生物资源活性成分的生物合成途径及其关键酶系统的阐明。

1891 年，Kossel 将植物新陈代谢区分为初生代谢与次生代谢，初生代谢物存在于所有植物中，是维持细胞生命活动所必需的，而植物次生代谢产物最初被定义成植物中一大类并非植物所必需的小分子有机化合物。随着研究工作的不断深入，人们认识到次生代谢是在植物长期演化过程中产生的，与植物对环境的适应密切相关，并非可有可无。而且次生代谢产物有许多功能，包括吸引传粉昆虫，作为植物自身及植物间的信号物质，抵抗病原菌及食草动物的侵害等。中药及天然药用生物中次生代谢产物种类繁多，生物合成途径千差万别。Keurentjes 等创造性地将遗传基因组学的新理论运用到代谢组学上。他们揭示出 75% 的代谢产物的差异性是遗传因素引起的，而不同生态型间的“代谢物”组成的巨大差别，表明了代谢物对提高植物对环境适应性有着重要作用，也决定了植物的营养、抗性和其他重要品质。在植物次生代谢产物生物合成研究中，提出了很多设想与途径，形成了多种学说，主要认为次生代谢产物有三个主要前体及合成途径，即莽草酸途径、氨基酸途径和乙酸途径。被子植物中一些相对保守的次生代谢途径也得到了很好的研究，如黄酮类、木质素的合成与调控，一些控制次生代谢产物合成的基因被克隆，酶被分离得到。采用 Northern 杂交法、实时荧光定量 PCR、原位杂交技术、免疫细胞化学技术、密度梯度离心和发光底物的细胞化学方法等，开展次生代谢途径相关酶类的器官、细胞及亚细胞定位研究也取得

了一定进展。然而，人们对特定活性成分的合成与积累过程，还所知甚少。

中药及天然药用生物次生代谢及次生代谢物的生物合成受到自身和环境中各种生物和非生物因素的调控。当外界因子作为信号被细胞识别时，首先是外界因子与细胞膜上受体的结合，引起膜的通透性、膜内离子分布等变化，最终导致胞内基因启动、酶活性的改变，这一系列反应应该是一个级联过程，需要有物质充当胞内信使，也即第二信使，主要包括 Ca^{2+}、cAMP、磷酸肌醇、G-蛋白、一氧化氮（NO）、水杨酸（SA）、茉莉酸（JA）、活性氧（ROS）等成分。信号被传递到细胞内以后，通过控制次生代谢途径中关键酶的合成来调节次生代谢产物的合成。现有的实验分别证明了 NO、JA、SA、ROS 等是参与介导外界因子诱发植物细胞次生代谢产物合成必需的信号分子（图 1）。然而上述信号分子在介导外界因子诱发植物细胞次生代谢产物合成过程中并不完全独立，不同信号分子在介导植物次生代谢产物合成过程中的相互作用机制还不十分清楚。

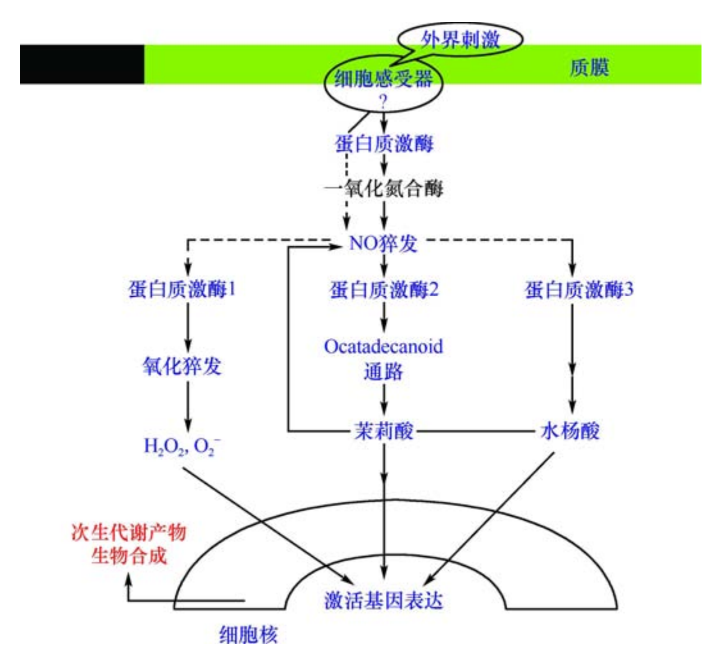


图 1　植物细胞次生代谢产物合成信号调控网络模式图

植物细胞不仅具有形态建成全能性，同时还具有物质代谢全能性，根据“细胞全能性”原理发展起来的植物细胞培养技术被视为是解决中药及天然药物资源可持续发展问题的一种新型生物技术。但到目前为止能够采用植物细胞培养技术进行产业化生产的天然活性物质种类非常有限。制约该项技术产业化应用的核心问题之一是培养细胞中活性物质的低产现象。针对这一问题，国内外研究者进行

了大量的研究探索，包括优质细胞系的选育、培养条件的优化、培养技术改进以及活性物质合成关键酶基因的克隆等。然而，到目前为止植物细胞中天然活性物质的低产问题仍未得到很好解决。解决这一问题的根本途径就是要揭示并阐明中药及天然药用生物资源活性成分的生物合成及其关键酶系统。

生物是一个整体，各个代谢途径不是孤立的。而中药及天然药用生物中代谢产物种类繁多，每一个代谢物的合成过程受诸多因素的影响，相关的关键酶的品种、数量较多，如何筛选和确定次生物质代谢的关键酶，关键酶基因克隆技术的突破，以及确定代谢途径的关键调节位点和关键酶系统等均是目前解决问题的关键和难点。利用系统生物学、基因组信息、功能基因组学、代谢组学及生物信息学等研究技术和平台，研究中药及天然药用生物资源活性成分的生物合成及其关键酶系统成为可能，并已有一定的基础。研究成果对利用分子调控方法来提高活性物质的产量，采用生物工程的方法生产活性物质，中药良种选育及确保中药材质量的稳定等均具有十分重要的意义。

参考文献

陈晓亚，刘培.1996.植物次生代谢的分子生物学及基因工程.生命科学，8(2)：8～11

董乐萌，巍建和，刘玉军，等.2009.植物次生代谢产物及相关酶的空间特异性分布研究进展.中草药，40(1)：153～155

徐茂军.2007.一氧化氮：植物细胞次生代谢信号转导网络可能的关键节点.自然科学进展，17(12)：1622～1630

Keurentjes JJ.2009.Genetical metabolomics：closing in on phenotypes.Current Opinion in Plant Biology，12(2)：223～230

Keurentjes JJ，Fu J，de Vos CH，et al.2006.The genetics of plant metabolism.Nature Genetics，38(7)：842～849

Menke FLH，Parchmann S，Mueller MJ，et al.1999.Involvement of the octadecanoid pathway and protein phosphorylation in fungal elicitor-induced expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic genes in *Catharanthus roseus*.Plant Physiol，119(4)：1289～1296

Morot-Gaudry-Talarmain Y，Rockel P，Moureaux T，et al.2002.Nitrite accumulation and nitric oxide emission in relation to cellular signaling in nitrite reductase antisense plants.Planta，215(5)：708～715

撰稿人：吴启南　江　曙　谷　巍
南京中医药大学

与药效相关的中药科学标准的建立

Establishment of Pharmacodynamics-Based Criteria of Chinese Medicines

反映中药内在质量的科学标准的建立是中药现代化、国际化的关键问题之一。中药的质量控制方法，经历了从传统的以形、色、气、味、质地等感官性状为主的经验鉴别方法，发展到近代的显微鉴别、理化分析，再到今天的以现代分析仪器为主要手段、以定量为主的质量标准的制订，不断发展，与时俱进，对于判别真伪、评价优劣，保证临床用药的安全、有效，起到重要作用。然而，中药基源复杂、化学成分复杂、药效物质不明确，给中药的质量评价和科学标准的制订带来极大的困难。目前仍有很多中药，存在着无标准或标准不完善的情况，或缺乏专属性鉴别方法，或指标成分含量与药效强弱不相关、活性成分甚至毒性成分无含量限度、对照品短缺，或分析方法不科学、不规范等诸多问题，成为制约现代中医药发展的瓶颈。如何运用中医药学、化学、生命科学、系统科学的理论和技术，实现中药复杂体系中结构多样的化学物质和相应功能的最大限度的表征，在此基础上建立真正反映其内在品质的、简便易行的质量标准，是中医药学研究领域的一大难题。

中药质量标准的研究和建立主要基于如下几种基本方法：性状鉴定、显微鉴定、DNA 标记鉴定、理化分析和生物检定。

性状鉴定：也称经验鉴定，是一种借助于感官对中药的形、色、气、味、质地、断面等进行直观的描述和判别。如人参状如人形，大黄形大而色黄，阿魏有阿之独特气味，甘草味甜而胜于糖，都十分逼真地概括出其品质特征。这种基于感官的鉴别手段，即便在科技发达的今天，仍不失为简便、实用的中药鉴别手段。但是，这种凭感官的鉴别毕竟是十分模糊的，会产生因人而异的判别差异。更重要的，难以对中药的内在品质进行科学、客观的判断与评价。

显微鉴定：是借助光学和电子显微技术，在显微镜下观察植物、动物、矿物的组织、细胞、晶体等微观形态特征，如人参中的树脂道，大黄中的簇状结晶，甘草中的晶纤维，黄连中的石细胞等，都是这些药材的专属性的鉴别特征。我国学者徐国钧等倡导并建立的显微鉴定技术，从《中华人民共和国药典》（1977 年版）开始正式成为国家法定的中药鉴别方法，在理化分析尚不发达的时代，在中药的真伪鉴别中发挥了重要作用，对于药材、饮片和以粉末直接入药的成方制剂，至今仍是必不可少的技术手段。当然，显微鉴定无法看出活性成分的有无和

含量高低，特别是对于经提取后的中药提取物、制剂。

DNA 标记鉴定：近年来，基于基因多态性的 DNA 标记技术在中药基源鉴定、真伪鉴别等方面进行了许多探索性的研究，取得了很多令人鼓舞的进展。DNA 分子遗传信息量大，不受环境因素和生物体发育阶段等因素的影响，通过选择一定的基因组 DNA 片段作为分子标记用于中药材的研究，有特异性强、稳定性好、取样微量等特点，具有传统中药检测方法无法比拟的优点。但因其对实验条件要求高，成本高等因素，对其适用性尚需要进行系统考察和评价。

理化分析：从 20 世纪 80 年代开始，随着中药化学成分研究的不断深入和各种色谱、波谱技术和分析仪器的快速发展，中药的化学成分分析在中药的鉴别和品质评价中逐渐占据主导地位。人们试图利用某种中药中所含有的 1 种或几种指标成分的有无或含量的高低来评价其真伪优劣，从而达到控制质量的目的。其中，薄层色谱法（TLC）鉴别和高效液相色谱法（HPLC）含量测定成为中药质量控制最常用的手段，也成为中国药典常规的化学分析方法。在指标成分的含量测定方面，逐渐由以往单一成分的测定向多成分同步测定发展；或采用 1 种对照品，实现多种成分的同步测定，以克服单一指标成分不能全面反映中药内在质量的问题。

然而，现行中药质量标准制订的基本模式是参照国外植物药的质量控制方法。对于化学药品而言，其分子结构清楚，量-效关系明确，鉴别、检查、含量测定可以直接作为药品质量控制的指标。但对于中药，尤其是复方制剂，仅凭 1 种或少数几种指标成分的检测难以体现其内在质量，这是中药与化学药品质量标准的根本区别。现行中药质量标准普遍存在着指标成分专属性不强，或含量很低，一般只有 1%、0.1%或 0.01%，其含量的高低与药效不相关或相关性不强，难以有效地控制其质量，与保证临床用药的安全性和有效性的要求尚有巨大差距。

近年来国内外研究者开始采用指纹图谱技术进行中药的质量控制。如基于中医药理论和实践的非线性特点，采用色谱指纹图谱、光谱指纹图谱分析来表征中药所含化学信息特征的全貌或轮廓，有“全谱分析”与“特征指纹提取”等不同的模式；或根据中药所含化学成分结构的多样性，采用多维信息特征图谱来进行中药的表征等。

指纹图谱技术部分地解决了单一或少数指标性成分难以代表全貌的现状，无疑是中药质量控制的一大进步。但该技术自身的问题也是显而易见的：①主观性。同一药物（药材、饮片或制剂），因样品处理方法、分析条件的不同，所表征的指纹图谱会面目全非，哪一张是反映待测药物质量的“指纹”或“脸谱”？多强的色谱峰计入统计计算？这主要取决于研究者的主观意向。②欺骗性。不同结构类型化合物在特定检测条件下的响应（response）会有很大不同，指纹图谱

所表征出来的众多的色谱峰的面积的大小，往往不代表其含量的高低，更不代表其活性的强弱。基于化学计量学的“模式识别”所得出的“相似性”，往往忽略了虽低于检测阈值，却具有较高含量或较强活性的成分对质量的贡献。③不确定性。不同基源甚至同种不同产地、不同加工方法的药材，其指纹图谱会有显著差异，哪一个样品是该药材的“种”模式，需要药效学的支持。

总之，基于化学分析的中药品质评价和标准制订呈现多元化、多极化的发展趋势，也体现多元分析技术的综合运用。

生物检定：除性状、显微、理化鉴别分析，“生物检定法”或“药理学评价体系”是药物鉴定和质量控制的重要手段。特别是对于有效成分不明确，指标性成分难以反映内在质量的中药，以生物学指标或药效毒理参数来评估其真伪优劣更具优势。

我国学者楼之岑早在 20 世纪 50 年代就利用小鼠口服植物性泻剂后排湿粪这一规律，建立了植物泻剂的生物检定方法。《中华人民共和国药典》2005 年版对水蛭的质量控制即采用抗凝血酶活性检测法，其他如益母草的缩宫素生物效价检测法、板蓝根的凝集素活性检验、大蒜油的抑菌圈检测法等。

近年来国内外学者将一些新的研究方法和技术应用于中药的质量评价，如基于药物-生物大分子的特异性相互作用生物色谱技术；将薄层色谱分离与生物活性测定相结合，集分离、鉴定和活性测定于一体的薄层色谱-生物自显影技术；通过测定生物体生长代谢过程中能量变化，间接判断药物的生物活性的生物热活性检测技术等。当然，生物检定法在专属性、灵敏度、准确度、简便性、费用等方面是否符合中药质量控制的要求需要进行系统的考察、评价和验证。

综上，中药的品质评价和科学标准的建立虽取得了长足的进步，但是，对于大多数中药，特别是组方复杂的复方中药制剂来说，目前所制订的所谓标准，还难以真正反映其内在的质量。尤其是对于药效成分、毒性成分的含量限度和范围制订，尚缺乏系统、深入的、基于实验药理学的研究数据和资料。

中药质量标准的建立应该以科学、先进、适用为原则。中药的成分复杂，但其分析方法却不能太过复杂，应该遵循从简单到复杂、再到简单的原则，即用简单的技术解决复杂的科学问题。对于中药的科学标准的建立，其核心任务应该是最大限度地阐明其与临床功效、毒性相关的有效成分或毒性成分，在此基础上，确立指标成分，并建立快速、灵敏、适用的分析方法。

需要解决的难题：

（1）一味中药中究竟含有多少种化学成分？

（2）这些成分的积累动态。

（3）哪些成分是有效的，哪些成分是有毒的，其量-效（毒）关系如何？

（4）单一和群体成分的关系，成分间的相互作用，组-效（毒）关系。

（5）应该对哪些成分进行测定，基于“有限的”指标成分的分析制订反映药物内在质量的科学标准。

中医药独特的理论和应用方式，决定了中药质量标准建立与评价的特殊性、复杂性。如何对中药复杂体系进行深入、系统的解析，抽提出能够代表其整体效价的量化的关键成分（因子），其含量高低与其生物活性在一定范围内具有总体的量-效关系，由此给出合格或不合格的客观判断，才能真正称得上是科学的质量标准。

参考文献

邓文龙.2001.创建中药质量的药理学评价体系.中药药理与临床,17(1):1～2

谷丽华,吴弢,张紫佳,等.2006.应用薄层色谱-生物自显影技术评价乌药等三种中药的抗氧化活性.药学学报,41(10):956～962

国家药典委员会.2005.中华人民共和国药典.一部.北京:化学工业出版社

毛希琴,邹汉法,罗权舟,等,2001.模拟生物膜色谱用于预测药物的小肠吸收.分析化学,29(10):1135～1139

王伽伯,李会芳,肖小河,等.2007.生物检定方法控制中药质量的思考.世界科学技术——中医药现代化,9(6):36～39

王峥涛.2006.中药质量标准研究进展与展望.中国天然药物,4:403～410

肖小河,金城,赵中振,等.2007.论中药质量控制与评价模式的创新与发展.中国中药杂志,32(14):1377～1381

谢培山.2006.基于传统的中药现代化与质量评价——继承与创新.世界科学技术——中医药现代化,(3):8～13

徐红,王峥涛,胡之璧.2003.中药DNA分子鉴定技术的发展与应用.世界科学技术——中医药现代化,5(2):24～30

Li YG, Zhang F, Wang ZT, et al.2004.Identification and chemical profiling of monacolins in red yeast rice using high-performance liquid chromatography with photodiode array detector and mass spectrometry. J Pharm Biomed Anal,35:1101～1112

撰稿人：王峥涛

上海中医药大学、上海中药标准化研究中心

传统汤剂的用药方式及其物质组分

TCM Formulae Decoction's Medication and Basic Regulation of the Material Composition

汤剂是中医临床医疗实践中应用最广泛的药物剂型。汤剂的应用充分体现了因人而异、随证加减的灵活性，遵循中医整体观念和辨证的理论原则。全面考虑了人与自然环境、心理、体质等因素，以及病因、病性、病时、病势等病理变化的因果关系，具有其他药物难以比拟的优势和特点。

汤剂的组效物质研究逐步深入。随着历代医者对汤剂临床运用及基础研究的不断深入，认为中药饮片在水煎制过程中发生着化学物质的相互作用和动态变化。汤液体系既包含了水溶性小分子（如糖苷类、酚酸类等）及水溶性大分子物质（如多糖类、糖肽类等），又由于各类成分相互作用所产生的助溶增溶等作用，使亲脂性成分在汤剂中的溶解度增大，故汤剂富含挥发性成分（如单萜、倍半萜类等）；各不同类型化合物间可能发生缔合、元素与成分间的络合等复杂作用（如 Ca^{2+} 与酚类化合物的作用等）。可见，汤剂实质上形成了一个内涵丰富的复杂化学体系。因此，探索传统汤剂的用药方式及其物质组效的基本规律，揭示传统汤剂的科学内涵，将对传统中医药的应用与发展具有重要的科学意义和应用价值。

汤剂传统用药方式的作用特点逐步明晰。现有研究证实：汤剂具有制备简单易行、增强疗效、缓和药性、能充分发挥配伍作用等优势与特色；汤剂进入胃肠后可直接被吸收，迅速发挥疗效。汤剂在规范的煎煮过程中由于各类型成分间的相互作用可使有效成分充分地溶入汤液中，使药物分子或离子能均匀地分散在汤液体系中。服后在胃内无崩解过程，故吸收较快，有效成分吸收全面，利用率高，能在较短时间内取得预期疗效。

汤剂物质体系的复杂性是科学难题。由于方剂是多个药材的有机组合，其中每种药材又包含多种有效物质，而每种化学成分又具有多种生物活性，因而方剂传统汤剂表现出多成分、多功能、多靶点的整体调和作用特点，构成方剂的复杂体系，正是方剂传统用药方式与其物质组效关系揭示的重点和难点。另一方面，汤剂在制备过程中同样受到多种因素的影响，如药材基源、产地、炮制方法、汤剂煎煮方法等，影响着汤剂中化学物质存在状态及其动态变化，从而对其临床疗效产生影响。

现代多学科交融使得传统汤剂的用药方式及其物质组效基本规律的揭示成为

可能。现代多学科交叉理论与方法技术的融合为传统汤剂研究提供了有力的支撑。汤剂组效物质系统是由引起汤剂特定功效的有效物质构成的系统，是方剂发挥作用的物质基础。而汤剂功效是对方剂效应物质系统与人体系统相互作用的概括和总结，方剂效应物质不仅包括某些单味药的原形成分，亦包括方剂在加工制备过程中以及人体内环境条件下形成的有效物质，如人胃肠道及组织器官中的代谢产物等。因此，阐明传统汤剂用药方式与复杂物质组效的基本规律应着重从以下几方面开展研究（图1）：

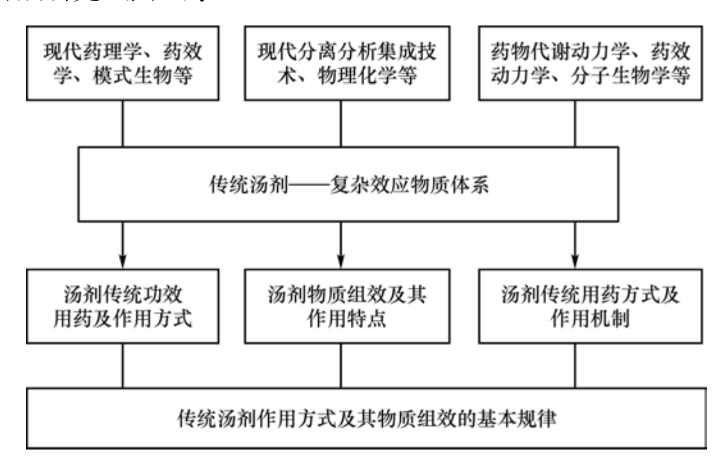


图1　传统汤剂的用药方式及其物质组效研究框架图

(1)将传统汤剂作为研究对象，利用物理化学、分析化学、有机化学、物理药剂学等多学科理论、方法和技术，从深层次探讨和揭示汤剂本身的理化特点及其与化学成分种类、状态等及其与功效、效应之间的关系。

(2)重视汤剂中物质群之间的相互作用的配体关系，通过从传统汤剂物质组效之间非线性相互作用入手，阐明汤剂有效物质组成、变化及其与生物效应之间的相关性。

(3)通过对汤剂发挥效应的化学物质群动态变化、生物效应变化及药物代谢等相关研究，揭示方剂作用物质、作用过程及作用机制。

(4)充分利用现代生物信息学方法和技术进行系统分析研究，针对方剂效应物质研究的各组相关数据进行分析、归纳，挖掘复杂效应物质之间、物质与生物效应之间、效应物质与人体作用过程之间的相关规律，从不同层面揭示传统汤剂作用特点与科学本质。

参 考 文 献

段金廒，宿树兰，丁安伟，等.2006.方剂复杂效应物质的研究思路与方法.中国药科大学学报，37

(Suppl):59～64
李雅,尹天雷,蔡光先,等.2007.补阳还五汤复方超微饮片浸泡液与传统汤剂的化学对比研究.中药材,30(11):9541～9543
刘洋,梁吉春,石任兵,等.2009.以化学成分指纹图谱表征的丹参炮制及其汤剂成分研究.北京中医药大学学报,32(4):256～258
魏刚.1998.标准汤剂论.中国中医药信息杂志,5(4):6～8
文昌凡,何忠莲.1998.中药用法与功效的关系.成都中医药大学学报,21(4):7～10
吴宏伟,唐力英,付梅红,等.2010.不同煎煮条件下黄连解毒汤有效成分分析.中国中医药信息杂志,17(2):42～44
张杨红.2009.中药汤剂制备过程中的化学变化.铜仁职业技术学院学报(自然科学版),7(5):25～26
Su SL,Hua YQ,Duan J-A,et al.2008.Hypothesis of active components in volatile oil from a Chinese herbs formulation,"Shao-Fu-Zhu-Yu Decoction",using GC-MS and chemometrics.Journal of Separation Science,31(6):1085～1091

撰稿人:段金廒　宿树兰　朱华旭
南京中医药大学

中药给药方案设计研究

Studies on Dosage Regimen for TCM

伴随系统生物学的发展，以及基于系统思想的系统医学（system medicine）的出现，联合用药、早期干预及个体化治疗等理念已成为现代医学所秉承的目标和医学实践的追求。传统中医学之辨证施治、治未病及配伍联合用药等理念以及其临床治疗实践已成为现代医学寻找有效预防或治疗手段的源泉，人们开始重新审视传统医学的理论意义及实践价值。然而，由于传统中医学的物质基础——中药的有效成分及作用机制还不能完全以一种规范的语言加以诠释，从而限制了辨证施治等个体化治疗理论和经验的阐明及传播，致使传统中医学价值的有效利用大打折扣。在这种背景下，如何从中药体内直接作用物质的分析监测角度，通过体内物质的动力学行为建立整体给药方案及个体化给药方案已成为制约中医临床疗效及国际化的关键科学问题。

药物与其他物质一样，其基本属性均是化合物，药物之所以能成为药物是由于其在一定条件下能对人体产生某种作用，从而表现出治疗活性或治疗外的毒性。对于一个具体药物而言，活性和毒性之间仅是剂量和给药方式的不同，而且能否产生达到治疗目的的作用直接取决于给药方案设计。而科学给药方案的设计是基于人体血药浓度（治疗药物浓度）的检测而实现的。

中药尽管是天然来源的药物或其配伍组合，但起直接作用的仍然是以化合物形式出现在血液中的物质。因此中药是产生治疗作用还是毒性，作用发挥的有效程度也直接取决于给药方案的合理性和针对性。

中医学对给药方案历来十分重视。在张仲景《伤寒论》中，对桂枝汤的服法记述颇详："桂枝去皮三两、白芍三两、甘草炙二两、生姜切三两、大枣十二枚。上五味，咀，以水七升，微火煮取三升，适寒温，服一升。服已须臾，啜热稀粥一升余，以助药力。温覆令一时许，遍身微似有汗者益佳，不可令如水淋漓，病必不可除。若一服汗出病痉，停后服，不必尽剂。若不汗，更服依前法。又不汗，后服小促其间，半日许令三服尽。若病重者，一日一夜服，周时观之，服一剂尽，病证犹在者，更作服，若汗出不止，乃服至二三剂。禁生冷、黏滑、肉面、五辛、酒酪、恶臭等物。"该段记述对配方、制法、剂量、给药间隔、药食相互作用等描述颇为详尽，对临床用药极具指导价值。至清代，徐灵胎在《医学源流论》中对服法的重要性加以特殊强调，指出"病之愈不愈，不但方必中病，

方虽中病，而服之不得法，则非特无功，而反有害，此不可不知也”，已认识到服药之“法”对临床疗效的影响。但限于认识程度以及方法和技术的缺乏，致使个别方剂的给药方案繁杂，且科学规范不足，难以继承，而大多数方剂的整体给药方案简单模糊。绝大部分都是嘱咐患者一日一剂，早晚分服。早饭前、晚饭后，中午随意已成为普遍的给药时间设计；而在给药剂量方面，同一药物也因医生或患者的不同而不同，虽然体现了个性化治疗，但更多是随意性带来的治疗效果的不稳定性；在药物与食物的相互作用方面，忌食辛辣、鱼虾、肥厚油腻等已是中药给药方案中食物禁忌的经验性概括，虽然有一定的实际意义，但盲目性大于针对性。

上述的诸问题，造成了中药的临床疗效不稳定、重现性差，安全性难以保证，社会公认度低。问题的根本原因是中药缺乏科学规范的临床给药方案，中药临床给药方案设计成为制约中药疗效发挥的关键科学难题。

给药方案包括选定最佳药物，确定剂型、给药途径、给药剂量（初始剂量和维持量）、给药间隔、给药时间和疗程，以及药物间相互作用，药物与食物相互作用等。合理的给药方案可以通过长期的经验积累来建立，也可借助药代动力学参数来建立；后者较前者更科学、快速、方便，但需进行治疗药物监测或临床药代动力学确定。

近年来，已开始借鉴化学药物的给药方案设计技术，开展中药临床科学给药方案设计。用药物动力学参数指导中医临床用药，解决合理用药问题，计算出首剂量、维持剂量、给药间隔时间以及制定各种给药途径的用药方案等。引进中药治疗药物监测（therapeutic drug monitoring，TDM）的理念，定量分析服用中药后生物样品（血液、尿液、唾液等）中中药活性成分及其代谢物浓度，探索血药浓度安全范围，并应用各种药物动力学方法计算最佳剂量及给药间隔时间等，实现给药方案个体化、科学化，从而提高药物疗效，避免或减少毒副作用，同时也为药物过量中毒的诊断和处理提供有价值的实验依据。

问题的难点：中药成分复杂，体内成分分析和鉴定是解决该问题的关键技术；同时中药多成分多靶点，多成分输入，整体效应输出，复杂成分与效应的阐明的难度导致药代动力学（PK）标记成分众多，药效动力学（PD）参数的整体复杂性，致使中药的 PK-PD 关系更加难以阐明，治疗药物浓度监测成为尤为复杂的事情。目前的研究数据均不足以支持中药群体给药方案，更不支持个体化给药方案的建立。从未来发展角度，问题的解决应是基于中医理法方药理论的指导，在正确认识方剂的配伍意义和方剂化学研究（*in vitro* 和 *in vivo*）的基础上，利用现代多维联用色谱技术，如 HPLC-UV-MS、UPLC-MS/MS、UPLC-MS-NMR、GC-MS 等技术，研究配伍条件下的方剂体内成分的动态变化规律，阐明中药或方剂的体内直接作用物质（有效成分或有毒成分）的 ADME/T 特

点；利用病理学及系统生物学技术，建立用于评价药物效应（量反应）的病症结合动物模型及细胞模型，并选择合适的效应模型，如最大效应模型、最大抑制效应模型、Sigmoid 最大效应模型等，从而阐明中药方剂体内直接作用物质（多成分或组分）的量-时-效相互关系，鉴定或确定中药复方体内直接作用物质中效应代表性成分（组分）（即 bio-/surrogate marker）及终端时间点（endpoint）；对 bio-/surrogate marker 进行 PK 与 PD 的相关性研究。在上述研究的基础上，利用计算数学及信息技术建立基于中药方剂多药物相互作用，多成分、多靶点的作用特点，适用于其多成分在配伍条件下 ADME/T 特征模式的中医方剂 PK-PD 的理论和方法，指导中药临床给药方案设计。即建立一个科学有效的适合中药方剂 ADME/T 特点的药代动力学研究体系，即中医方剂药物计量学（pharmacometrics for TCM formula），结束中药 PK 研究理论及方法长期混沌的局面，规范方剂 PK 研究行为。在此基础上，进一步建立中药及方剂的临床用药体内成分监测系统，建立科学规范的给药方案。

参考文献

范恒，沈霖．2010．伤寒论．北京：中国中医药出版社

郭立玮．2002．中药药物动力学方法与应用．北京：人民卫生出版社

王喜军，张宁，常存库，等．2006．方剂配伍规律的研究现状和未来发展．世界科学技术——中医药现代化，8：13～16

王喜军．2009．基于药物代谢组学的中药及方剂中组分间协同增效作用．中国天然药物，7：90～95

吴水生，郭改革．2006．汲取中药药动学理论精华改进中医临床用药．中国中医药科技，6：423～424

Cao HX，Xi CN，Sun H，et al．2010．Pharmacokinetics-based elucidation on disparity in clinical effectiveness between varieties of Zhi Zhu Wan，a traditional Chinese medical formula．Journal of Ethnopharmacology，128：606～610

Wang XJ，Lv HT，Sun H，et al．2008．Simultaneous determination of 6，7-dimethylesculetin and geniposide in rat plasma and its application for pharmacokinetic studies of Yin Chen Hao Tang preparation．Arzneimittel-Forschung/Drug Research，58：336～341

Wang XJ，Sun WJ，Sun H，et al．2008．Analysis of the constituents in the rat plasma after oral administration of Yin Chen Hao Tang by UPLC/Q-TOF-MS/MS．Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis，46：477～490

撰稿人：王喜军

黑龙江中医药大学

中药量-效关系表征与评价

The Representation and Evaluation of TCM 's Dose-Effect Relationship

在中医临床辨证准确、治则治法正确的前提下，恰当的用药剂量是保障用药安全有效的关键。中医方药中蕴涵的量-效关系是先辈们在长期的临床实践中获得的经验积累，体现了中医临床用药规律，是所谓“中医不传之秘在于量”的基础。然而，随着人类对社会环境的适应和对药物的耐受以及疾病谱的改变，客观上要求中医用方用药在继承的基础上不断创新发展，以保证临床的有效性和安全性。方药用量是临床取效的决定因素之一，科学内涵丰富。由于中医方药体系的复杂性以及历史发展中度量衡的沿革变化和采用标准不同，使得用药剂量变化范围不易定论。目前关于方药量效关系的研究主要停留在理论阐述、经验积累和个案分析探索阶段。因此以中医药理论为指导，深入阐明中医方药独特有效的量-效规律和系统思维模式及其知识体系，是当代社会人口健康的客观需求，是中医药发展的必然趋势，对于指导临床合理用药与提高临床疗效具有重大的科学价值和理论意义。

WHO 于 2008 年 3 月底在意大利米兰举行的中医临床专题会议专门讨论中医临床技术与方案，其中重点涉及临床量-效关系评价等相关问题。全球中医药联盟、中欧框架协议等大型国际中医药学术联盟均设有专门的小组或专题研究方药的临床与基础量-效关系。在科技部的大力支持下，北美、欧洲的中药临床示范性临床试验启动。目前，已在美国开展Ⅱ期临床试验研究的治疗肝纤维化方药扶正化瘀片和治疗痛经的经典名方桂枝茯苓丸。这些工作均有多个海外合作者，并涉及药物剂量，将促进相关方药量效关系的国际研究。既往方药作用机制主要围绕病理机制进行探讨，如日本将中药复方小柴胡汤作为一个整体药物，研究方式与西药无异。近年来，我国学者根据中医药特点进行了相关研究，如陈竺院士的雄黄-青黛复方中药成分配伍研究、张伯礼院士的方剂关键科学问题的基础研究——组分配伍研制现代中药、刘平教授的方证药理研究、黄熙教授的证治药动学研究等，相关结果受到国际学术界的关注，为方药量-效关系研究的国际化奠定了基础，2009 年科技部将“基于经典名方的方药量-效关系基础研究”正式列为“973”中医理论专项。段金廒教授等运用数量化理论、快速聚类法、关联分析法、加权层次聚类法、建立数学模型、定量计算方法和模拟方法等对临床用药

剂量、药物功效等进行量-效关联分析；在方药用药规律、方剂药性配伍及方剂研究的数据挖掘方法方面开展了系列工作，进行了方药量-效关系研究思路与方法等方面的探索，并提出中医方药具有双相二时段特征量-效关系理论观点。

中药及方剂量效实质是药物作用于机体产生特定生物效应的量，源于临床实践经验，它既体现药物量-效关系的基本属性和特征，又具有复杂效应物质产生整合效应（包括协同或拮抗取效或减毒增效）的中医药特点的整体量-效变化规律。中药剂量变化与中药药效物质成分密切相关，而中药成分复杂多样，导致功效变化和作用机制的复杂性。因此，建立适宜的中药量-效关系表征方法与评价体系一直是中医药现代研究的科学难题。

根据中医临床用药规律及量-效关系特点，运用中药药效学、药理学、病理学、毒理学等方法和手段，对中药剂量与效应间的变化进行研究，建立适宜的能够阐明中药量-效关系特点的量-效关系评价方法、模型与技术，以诠释中药量-效关系基本理论和科学内涵。依据相应证候病因病机及其生理病理特点，从不同层面的生物效应评价指标验证和揭示中药用药剂量与中医功效的关联性。如采用整体动物模型活性指标研究方药用药剂量与中医功效的相关性；采用组织器官、细胞及分子基因水平研究中药量-效关系内在机制。

采用三维信息技术（图1）表征中药及方剂量-效关系可能是一个研究中药量效关系的有效途径。将每味药看作一个单元，整个方药的药味群组成药物谱作为第一维信息；系列活性组成方剂的效应谱作为第二维信息；方剂中各药味对全

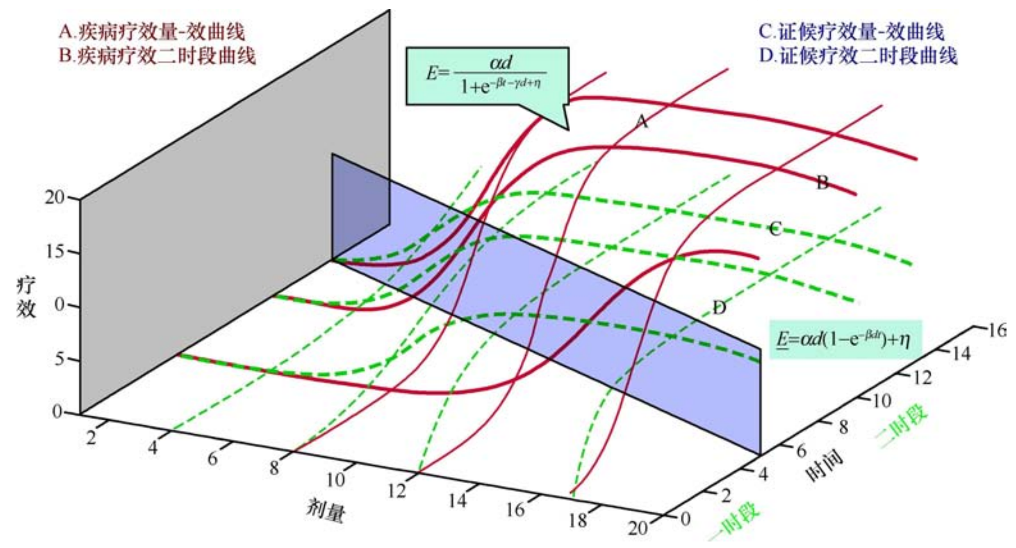


图1　方药量-效关系三维表征模式图

E. 效应强度；*t*. 时间；*d*. 剂量；α、*g*. 剂量因子；*b*、*h*. 形状因子

方的生物效应贡献作为第三维信息，通过变量设计分组，将各味药的剂量变化与总复方功效变化进行相关性分析，构建方药用量与生物效应的量-效关系研究模式。三维信息研究的关键有三个要素：①完整性。基于全方药味配伍的各药味变量设计，由于方剂配伍可能存在各药味间相互影响、相互制约，拆方、分离分段可能会掩盖全方中的配伍效应，因此各个分组必须含有每一味药。②剂量变化。剂量变化不是整方的大中小剂量变化，而是利用分组，对每一味药进行变量设计，使每味药均在剂量上有多水平变化。③交互变化。即不同药味之间不能平行变化，而突显出各药味变量对全方的效应影响，防止药味间相互作用被掩盖而呈现出假阴性或假阳性。

参 考 文 献

段金廒，范欣生，宿树兰，等．2009．中药及方剂量效关系的研究进展与思考．南京中医药大学学报，25(4)：241～245

范欣生，段金廒，王中越，等．2009．中药量-效关系特征问题的探讨．中华中医药杂志，25(1)：270～274

华永庆，段金廒，宿树兰，等．2008．用于不同证型痛经的四物汤类方生物效应评价(Ⅰ)．中国药科大学学报，39 (1)：72～76

华永庆，谢海棠，段金廒，等．2009．当归芍药散治疗痛经的方药量-效关系研究．中国临床药理学与治疗学，14(5)：557～563

李文林，郭立中，吴勉华，等．2009．层次聚类法对周仲瑛哮喘病案方药量-效关系的研究．南京中医药大学学报，25 (1)：17～20

尚尔鑫，范欣生，段金廒，等．2009．《金匮要略》方药用量与功效变化规律研究．南京中医药大学学报，25 (1)：15～19

张伯礼，王永炎．2005．方剂关键科学问题的基础研究——以组分配伍研制现代中药．中国天然药物，3(5)：258～261

Huang X, Qin F, Zhang HM, et al. 2009. Cardioprotection by Guanxin Ⅱ in rats with acute myocardial infarction is related to its three compounds. J Ethnopharm, 121(2): 268～273

Mu YP, Liu P, Du GL, et al. 2009. Action mechanism of Yi Guan Jian Decoction on CCl_4 induced cirrhosis in rats. J Ethnopharm, 121(1): 35～42

Wang L, Zhou GB, Liu P, et al. 2008. Dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula realgar-indigo naturalis as an effective treatment for promyelocytic leukemia. PNAS, 105(12): 4826～4831

撰稿人：唐于平　段金廒　范欣生

南京中医药大学

以中药“十八反”、“十九畏”为代表的中药配伍禁忌研究

Incompatibility Study of TCM Represented by “Eighteen Incompatible Medicaments” and “Nineteen Mutual Restraint Medicaments”

随着人类社会的进步和对安全用药意识的不断增强，中药配伍禁忌和用药安全日益受到社会的广泛关注，成为中医临床用药安全有效亟待解决的重大科学问题。

中华民族先贤在千百年生活实践和遣方用药诊病疗疾中总结形成以“十八反”、“十九畏”为代表的中药配伍禁忌体系，在一定程度上保障了中药用药的安全和有效。但是，长期以来以“十八反”、“十九畏”为代表的中药配伍禁忌研究停留在经验阐释和简单验证水平，严重影响着中医临床合理用药和安全用药。因此，依据中医药配伍理论，以“十八反”、“十九畏”为研究对象，通过古今文献考证和分析，阐明以“十八反”、“十九畏”为代表的中药配伍禁忌理论的历史沿革、内涵与外延；提出中药配伍禁忌研究思路，创建客观表征量-毒-效配伍关系的研究模式、方法和技术体系，回答反与不反、为什么反、怎么反的关键科学问题；阐明反药配伍组合妨害治疗的减效机制与理论基础；揭示含有反药配伍组合的代表性方剂的宜忌条件和配伍关系；通过实验研究与临床回顾性资料相互验证，研究在不同病证条件下“十八反”、“十九畏”药对所呈现出的毒效表征，提出和建立相应的禁忌条件与临床用药指导原则。

运用现代科学技术与方法建立中药配伍禁忌适宜的研究技术体系，揭示中医传统中药配伍禁忌的合理性与科学性，明确以“十八反”、“十九畏”为代表的中药配伍致毒、配伍减效的客观事实和依据，在方-药-病-证的基础上阐明量-毒-时-效关系，为建立中药配伍禁忌安全用药的标准体系提供科学依据，形成并完善中药配伍禁忌理论，从而丰富和发展中药配伍理论体系（图1）。

最终目标是通过中药“十八反”、“十九畏”配伍关系及其科学实质的系统研究，为临床用药安全有效提供指导，为《中华人民共和国药典》中药配伍禁忌内容的修订提供依据，为我国中药配伍禁忌和药物安全性研究提供示范，为研究制定我国中医临床用药配伍禁忌指南和安全用药指导原则、建立中药安全用药预警系统奠定基础和提供科学依据，为丰富和发展中医药配伍理论，服务于经济社会发展和满足人们健康需求做出应有的贡献。

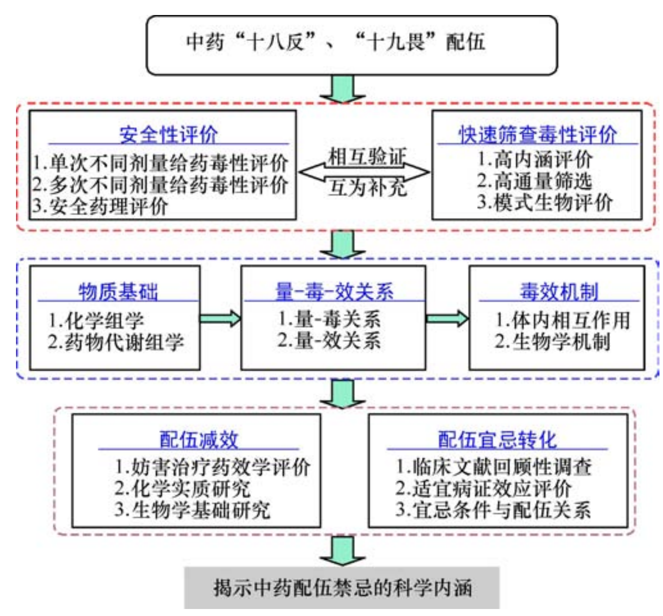


图 1　中药“十八反”、“十九畏”研究模式

参考文献

高月 .2007 .基于药物代谢酶的中药毒性研究 .毒理学杂志 ,21(4):282

高晓山 ,陈馥馨 .1986 .近年来中药十八反、十九畏药理研究进展与展望 .黑龙江中医药 ,(2):52～55

高晓山 ,陈馥馨 ,刘源 .1991 .中药十八反研究 .北京 :中医古籍出版社 ,1～48

黄文权 ,程相岭 ,肖鸿 ,等 .2001 .中药十八反部分禁忌中药的毒理实验研究 .成都中医药大学学报 ,24(1):45～47

胡建平 ,刘春芳 ,林娜 .2006 .现代实验技术在中药遗传毒理学研究中的应用 .中国实验方剂学杂志 ,12(8):66～70

彭惠珍 ,钟赣生 .2006 .“十九畏”研究浅述 .北京中医药大学学报 ,29 (9):585～588

宿树兰 ,段金廒 ,李文林 ,等 .2010 .基于物质基础探讨中药“十八反”配伍致毒/增毒机制 .中国实验方剂学杂志 ,16 (1):123～129

唐于平 ,吴起成 ,丁安伟 ,等 .2009 .对中药“十八反”、“十九畏”的现代认识 .中国实验方剂学杂志 ,15 (6):79～81

王宇光 ,高月 .2003 .中药十八反的药理毒理研究进展 .中国实验方剂学杂志 ,9(3):3～6 ,60

王宇光 ,高月 ,柴彪新 ,等 .2004 .人参、藜芦合用对大鼠肝 P450 酶活性及 mRNA 表达的调控作用 .中国中药杂志 ,29(4):366～370

撰稿人：段金廒[1]　林　娜[2]　钟赣生[3]

1 南京中医药大学

2 中国中医科学院

3 北京中医药大学

现代中药复方制剂理论、技术与评价体系研究

Study of the Theory, Technology and Evaluation on Modern Traditional Chinese Herbal Pharmaceutics

中药复方是中医用药的主要形式，是中医治法治则在组方用药上的具体应用，显示了传统医药防病治病的特色，中医临床多以中药复方汤剂形式给药，但在古籍中，不乏以制剂形式给药的记载，如口腔含化的“贝母丸”等。

现代中药复方制剂的研究和开发始于20世纪70年代，随着各种化学药物制剂的引入，以及新药注册管理办法的实施，同时为了适应现代临床用药的需要，现代中药复方制剂不断出现并推向市场。据统计，已经上市的现代中药复方制剂达到6000余种。由传统丸、散、膏、丹等发展为片剂（包括普通片剂、分散片、控缓释片）、胶囊剂、滴丸、注射剂、外用贴片等现代剂型。

1. 中药复方制剂设计理论难点

现代中药复方制剂设计思路大部分是借鉴现代药物制剂设计理论，在中药剂型设计中进行应用。通常将中药提取后入药，采用物理药剂学性质、生物药剂学与药物动力学性质、中药体外溶出行为等现代制剂技术将中药制备成现代剂型。近年来，提出“证-方-剂对应”是中药制剂临床起效的前提，“法随证立、依法统方、剂依法制”是理法方药一体化的归结，根据疾病证候的性质、特点与规律，方剂配伍原则，充分挖掘传统中医施药原则和方法，建立现代中药复方制剂的基本理论。如提出复方释药系统的概念，如以舒胸片为模型药物将处方药材提取精制后制成微丸剂，然后依据人体胃肠道的自然pH变化情况，制成三种pH依赖型释药微丸并灌入硬胶囊内，制成缓释胶囊，制备多元定位释药系统；以复方丹参中效用组分及成分，分别制成冰片、三七、丹参效用组分速释层、冰片三七缓释层、丹参缓释层等，达到制剂中药物同步释放，快速起效和延效作用的同步释放系统等。

但在此基础上，如何将传统设计理念和现代药物设计理论有机融合，结合方药的理化性质、生物学性质、药动学性质、药效学性质和剂型特征，系统研究“方、证、剂对应”关联规律，形成中药制剂与方剂的主治病证属性（病性、病位、病情、病势）及该方组方特性（作用部位、性质、强度、趋势）相对应的基本思想，构建符合中药特点的中药剂型设计理论，最大限度地实现中医药“方-证-剂”对应理论与现代制剂设计两种理论体系的有机融合，是中药复方制剂设

计理论需要解决的重要难点。

2. 中药复方制剂制备技术难点

由于绝大多数中药复方产生疗效的物质基础尚未清楚，不同工艺是否存在功能主治的差异亦不明确，中药中成分取舍的确定缺乏依据；大多数中药或中药复方一般为有效部位或有效部位群，其形式多为膏状物或无定形粉末，物理化学性质也比较复杂，要制成同步释放制剂甚至控、缓释制剂，这就给辅料的筛选及制剂处方的设计增加了困难，成型工艺的难度也较大。

符合中药特点的辅料研究。目前现有的辅料品种大部分适用于化学药品，针对中药提取物易吸湿及中药复方制剂高载药量的特点，辅料制剂性能研究薄弱，特别是与中药制剂的完美结合还存在困难等，开展改性、预混优化辅料的研究，从而提升中药制剂技术水平。

符合中药特点的设备研究。中药复方制剂的制备设备借鉴化药设备，针对中药复方成分复杂，制备过程中存在吸湿及难以崩解等因素，对传统中药制剂制造设备进行了改造，研制出适应中药复方制剂要求的制造设备。

基于符合中药特点的辅料及设备研究的基础上，对于现代中药复方制剂的制备技术研究，提出从“调控优化”的思维方式研究中药制剂的调控优化目标、对象和策略方法，结合雾化沉积分散技术、多组分膜控释放技术、多组分骨架控释放技术、多元释药技术、泡腾片膜覆稳定化技术等制备新技术导入，以制备符合中药特点的中药复方制剂。

3. 中药复方制剂评价技术难点

虽然现代中药复方制剂在中医临床治疗中发挥了一定的作用，但仍存在和面临着许多问题。由于中药复方制剂评价目前仍借鉴化药评价手段，难以对已上市的现代中药复方制剂做出合理性的评价，故出现同方异名、同名异方和临床疗效差异等现象。如果不考虑给药途径、工艺因素则丹参片、丹参颗粒、丹参膏、丹参滴注液、丹参注射液、注射用丹参与丹参舒心胶囊、丹参舒心颗粒、丹参酮胶囊、丹参舒心胶囊属于同方异名；如果考虑处方中剂量、工艺因素，则复方丹参滴丸由于处方中药味剂量与其他复方丹参制剂不同，亦属于广义的同名异方，临床是否需要如此多样的同类制剂也难以判定。又有许多学者尝试用综合的方法对现代中药复方制剂进行评价，如指标性成分释放度与血清药理学结合、指标性成分释放度与放射性核素标记结合、高效液相指纹图谱与 GC-MS 联用等有效物质组学的分析方法。

因此，以疗效为中心，探讨“中药多组分体外释药-体内药物动力学-效应动力学的关联规律，建立多组分制剂生物效应的综合评价技术体系”、“采用流变性能及微观结构分析半固体制剂的稳定性，建立中药经皮给药的稳定性评价研究模式”等是中药复方新制剂研究评价所需要解决的关键问题。

现代中药复方制剂的理论、技术与评价体系的研究和建立，须从以下几方面研究入手：①建立传统剂型设计思路的数据库。整理中医药经典典籍，完善数据挖掘技术等数据处理系统。②方剂药效物质基础与机制研究基础。在基本阐明方剂配伍及其化学物质基础的前提下，为现代中药复方制剂研究奠定基础。③中药生物药剂学性质及药代动力学研究基础。可用于优化中药剂型和给药方法，实现中药复方制剂“给药精密化”。④新型制剂辅料的研究基础。针对中药浸膏物料的黏性大、吸湿性强及要求载药量高等问题，开展辅料的功能评价，改性、预混优化和再评价研究，实现辅料规格细分与系列化，提高辅料的制剂性能。⑤中药制剂制造设备基础。对传统中药制剂制造设备进行了改造，研制出适应中药复方制剂特点的制造设备。⑥现代中药复方释药系统的评价方法基础。构建以疗效为中心，中药速释、缓释制剂、中药经皮给药制剂、结肠定位及多元释药的关键评价技术。解决现代中药复方制剂“有其术、而无其道”、“只知其‘制’而不知其‘治’”的局面，彻底改变临床出现“方灵药不灵、材好药不好”的现象。

参考文献

李莉，李鑫，邱文强.2003.冠心苏合丸pH依赖型梯度释药微丸的制备工艺.黑龙江医药，16(3)：208～210

罗晓健，张汝华，毕开顺.2001.复方丹参多层缓释片及其体内外评价方法的研究.沈阳药科大学2001年博士研究生毕业论文

宋洪涛，郭涛，张汝华，等.2002.麝香保心pH依赖型梯度释药微丸的研究.药学学报，37(10)：812～817

宋洪涛，张倚，郭鑫金，等.2005.采用多元定时释药技术制备复方中药舒胸缓释胶囊的研究.福州总医院学报，12(4)：235～238

闫惠俊，颜正华，龙致贤.2003.肠安康微丸制备工艺及其结肠定位释药评价.北京中医药大学2003年博士研究生毕业论文

杨冬丽，于叶玲，唐星，等.2005.复方丹参pH依赖型延迟释药微丸在家犬体内的药效动力学.药学学报，40(12)：1075～1079

朱盛山，袁旭江，李苑新.2006.治疗冠心病中药复方缓释制剂均释放度的研究.世界科学技术，8(1)：44～47

撰稿人：刘红宁
江西中医学院

方剂配伍的机制研究

The Mechanism of TCM Prescription

中医方剂是在辨证审因确定治法之后，按照一定规矩，选择适宜的药物，并明确其用量，使之主次分明、切中病情的药物组合。中药的功用各有所长，亦各有所偏，通过合理的配伍，增强或改变其原有的功用，调其偏性，制其毒性，消除或减缓其对人体的不利因素，使各具特性的中药发挥综合作用，所谓“药有个性之专长，方有合群之妙用”，即是此意。故方剂的核心是配伍。方剂配伍的机制研究是中医药现代化研究的重要组成部分，对临证组方及中药新药的研制开发等均具有重要的指导意义。如何能够阐明方剂配伍的机制并使其研究成果符合中医药理论是该研究的重点和难点。

当前对方剂配伍的机制研究主要从理论研究、临床研究和实验研究三方面开展。

理论研究是方剂配伍机制研究的基本环节。方剂配伍机制研究，应从传统文献整理出发，首先明确在“中药饮片”这一层次的配伍规律。没有传统理论作基础，配伍研究就是无的放矢，就无法在实验研究和临床研究的基础上进行理论升华，然后再回归到中医理论上来，使之得到进一步发展。当前的理论研究多运用传统文献学研究方法总结方剂的用药特点和配伍规律，或应用计算机技术对方剂进行逻辑处理、数据挖掘，以便能够更客观、更深入地认识方剂的配伍规律。

临床研究是方剂配伍机制研究的基础。方剂配伍机制研究的主要对象是具有一定临床疗效的方剂，其研究的终极目标是提高方剂的临床效价。方剂学的研究，尤其是配伍研究一旦脱离了临床实践，就会成为无源之水、无本之木。近年来，越来越多的学者强调临床疗效为方剂研究的首要前提，使方剂研究呈现出回归临床的趋势。在这一趋势的主导下，方剂配伍机制研究主要从两方面开展：一方面以名老中医经验传承为重点，总结当代医家的个性化组方规律；另一方面以循证医学的客观化研究方法对方剂进行临床研究，通过设有对照的、随机的大样本的方剂疗效观察总结方剂的配伍机制。如国家科技部、中医药管理局重点资助项目——名老中医临证经验与学术思想的总结与传承方法研究以及国家对常见病、疑难病的治法及组方研究。

理论研究和临床研究是在中医思维指导下开展方剂配伍机制研究的重要方法和模式，以上研究亦取得了很多成果。当前研究的主要难点在于如何使方剂配伍

机制得以客观化的体现，实验研究则是深入研究方剂配伍机制客观化的重要环节。实验研究的重要前提是能制作出合乎中医基本要求、最大限度贴近临床“证候”的动物模型。不可否认方剂有“因病而设”者，但主要还是“因证而设”，“证候”作为方剂的主要干预对象是毋庸置疑的。但是，中医“证候”的概念除病理生理因素外，还包括环境、心理、精神等因素，很难用现代生物医学的实验指标对方剂单纯干预证候进行疗效评价。对此，采用病证结合的研究方式是目前相对较为可行的方法。制作病证结合动物模型的目的是满足或尽最大努力贴近中医证候的发生机制或其中的某一个环节。即便如此，该模型的制作从技术角度来说仍有一定的困难。这是影响方剂配伍机制研究乃至中医药现代化研究的关键问题。

在实验研究方面，国内外进行了大量药效学、分子生物学及血清药物化学等方面的研究，在一定程度上说明了方剂组成的合理性及中药配伍应用的优越性。随着研究进程的逐渐深入，越来越多的研究者认识到，方剂药效的发挥，必然依赖于客观的物质基础，药效的物质基础不明，自然无法研究其配伍机制等深层次的问题。于是，方剂配伍机制研究开始向其纵深方向发展，向方剂中各药效物质（有效组分和有效成分）间的内在联系的方向发展，运用多种现代科技手段探求在微观层次上的配伍机制，试图在药效物质（有效组分和有效成分）层次上配伍组成高效的方剂。

近年来，以上研究取得了很大的成绩，为在微观层面上阐明方剂配伍的机制做出了很大的贡献。然而随着研究的深入开展，越来越多的学者意识到完全运用这种还原论的方法研究方剂，其成果不全具有普适性。应用植物化学的手段进行分离提取是方剂配伍机制研究的一种必要手段，但是探求方剂的药效物质基础与作用机制的目的不是寻找单一结构的化学药。单味中药的化学成分极其复杂，有很多成分尚未得知，即便是一些已知的成分，亦未能完全明确其药理作用。由多味中药组成的方剂的化学成分则更为复杂，即便是提取分离出全部的化学成分，亦很难说明其饮片层次的配伍意义，其原因在于这种还原论的研究方法偏离了中医自身的规律。中医数千年来的思维模式决定了临证组方既有严格的原则性，又有极大的灵活性，要结合患者的病情、体质、年龄、性别与季节、气候以及生活习惯等“三因制宜”，才能组成一首配伍精当，具有较高临床疗效的方剂。因此，在中医药理论的指导下，如何运用现代的研究方法和手段更客观地揭示方剂配伍机制，成为制约方剂现代研究的瓶颈。

方剂配伍机制研究必须在中医思维模式的指导下进行，其研究方法和模式既要在传统中医药研究层次上有所发展，又要有别于国外天然药和植物药的研究方式。此问题之关键在于如何有效地开展体现中医辨证论治思维模式的方剂配伍机制客观化的研究。中医药理论的发展是多学科共同发展的结果，唯有在人类整体

科技水平不断提高的同时，将中医药学与多学科有机结合，通过多学科、多角度的探索，才能日益接近方剂配伍机制的科学内核。

参 考 文 献

韩涛，王均宁，刘莹，等.2003.对方剂配伍临床研究中几个问题的探析.北京中医药大学学报，26(4):17
李冀，李晓琳.2005.论药对与方剂配伍的关系.中医药信息，22(1):31
李冀.2009.方剂学.北京:高等教育出版社，1～17
罗国安.2007.整合化学物质组学的整体系统生物学——中药复方配伍和作用机制研究的整体方法论.世界科学技术，9(1):10
袁久荣.2005.关于方剂学科发展中若干前沿关键问题的研究.中国中医基础医学杂志，11(9):681
张家玮.2002.方剂学发展史上的两个特征.中华医史杂志，32(3):135

撰稿人：李　冀
黑龙江中医药大学

中药药对的组成规律与其在方剂配伍中的地位和贡献

The Composition Regulation of Drug-Pair and Its Position and Contribution in Prescription Compatibility

药对是临床常用的配伍形式，是历代医家长期医疗实践的经验总结和精华所在。药对的组成相对固定，结构精炼，体现中药配伍的基本特性和组合规律，具有丰富的科学内涵。药对功效既与其中单味药的性能功效有关，又胜于单味药的简单相加，配伍后功效增强，治疗范围扩大，还可减轻或消除不良反应，灵活应变于病证变化。药对数量众多、类别复杂，其中相须相使配伍临床应用得最广，是药对组成的主要形式。

依据据证配伍的中医临床用药原则，医家在临床形成了数量众多的有效药对，以应对复杂多变的病证治疗需要。依据药物性能功效以及证候特点，药对组成各有侧重，如从功效进行配对、依性味进行配对、据引经或趋向进行配对、从治法特点上进行配对等。因此，药对组成的内在规律蕴含于药对的多样性组成方式中。祖国医学对于中药功效的阐述，主要体现在中药药性理论即四气五味、升降沉浮、归经、有毒无毒等方面。药对的组成不仅有理论、有根据，而且具有一定的内在规律性。药对组成的内在规律性通过药对组成的方式而反映出来。临床应用多依据药物“七情合和”组成，秦汉时期《神农本草经》首次提出了“七情”理论，形成药对理论基础。药对主要组成方式包括相须配对、相使配对、相畏配对、相杀配对等。中药药对组成规律的系统研究，必将进一步丰富中医配伍理论，揭示其科学内涵，将对指导临床合理用药与提高临床疗效具有重要的理论意义和科学价值。

药对与方剂既有区别又有广泛的联系。其共同的组成原则均是协同增强药物的作用，佐制药物毒性或烈性，消除对人体的不利因素，提高疗效和适应复杂病症等。组织严谨、方义明确、疗效可靠的方剂，往往包含了若干个药对，或由某一药对为主组合而成。例如，当归-川芎、熟地-白芍两个药对组成补血代表方四物汤；四物汤基础上配伍香附-木香药对组成香附四物汤；配伍桃仁-红花药对组成桃红四物汤；配伍黄连-黄芩药对组成芩连四物汤等。典型药对体现了名医处方中存在核心组织结构，有一定的代表性和覆盖度，是其临床经验和处方特点的体现，其中蕴含着医家对药物的选择、药物的组配、对病机的认识、患者的机体状况及调整途经等信息。通过“药对”结构和病-症-证之间的关系研究，不仅有

助于了解中医处方思维特点，也有助于从药物功效指征与其适应病症角度理解方剂的复杂结构。药对在临证治疗学中，应用最为广泛和普遍，具有重要的现实意义。药对可作为方剂的主要部分，其功用与方剂功用保持一致；作为方剂的次要部分，以加强和辅助方剂的功用主治；作为方剂的联合部分，在方剂中起到衔接作用。因此，通过药对与方剂的配伍关系进行探讨，有利于药对本身组成规律的揭示，也有利于方剂配伍规律的剖析与发现，有助于临床有效用药及提高临床治疗效果。

许多学者针对中药药对的组成特点开展了研究工作。高秋涛等对黄芪-当归药对配伍关系研究结果证实该药对触发 MCF-7 细胞雌激素受体 α 磷酸化，而单味黄芪或当归并不能产生此生物效应；黄芪、当归两药配伍之当归补血汤比单味药具有更为显著的促进 T 细胞增殖作用。陈婷等对由黄柏-苍术药对组成二妙散研究表明，配伍后对于细胞免疫应答所致的炎症反应有抑制作用，且协同作用显著。段金廒、唐于平等基于药对量-效关系的认识与思考，提出药对协同增效作用存在最佳量-效配比关系；同时开展了当归-川芎药对不同配比功效变化规律研究，证实其挥发性成分与其抑制小鼠离体子宫平滑肌收缩效应密切相关，当归-川芎药对挥发油对小鼠离体子宫收缩效应强度不同，以当归-川芎（2∶1）效应最佳。对乳香-没药配伍药对的研究表明，其水煎液抗炎、镇痛、抑制血小板聚集作用均比单用有不同程度的增强，且两药配伍前后其挥发性和非挥发性物质组成均有一定的变化。对蒲黄-五灵脂药对研究表明，配伍用药对原发性痛经模型和乙酸致痛模型效应显著提高等。肖小河等对吴茱萸-当归药对研究表明，主成分随吴茱萸当归配比变化呈现转移率提高的规律；同时，随着吴茱萸比例的增加，阿魏酸溶出率也逐渐增高，两药味以 6∶4 配伍时含量为高，这与《金匮要略》温经汤中该药对配伍比例相一致。

由于中药化学成分复杂，作用机制不清，依据四气五味、升降沉浮、归经、有毒无毒等中药药性理论和相辅相成或相反相成的组合原理，两药组成了药对，其物质基础和相互作用机制将更为复杂，以及它们在方剂中的作用和贡献也将因证候、用量等不同而有差别。因此，揭示中药药对的组成规律与其在方剂配伍中的地位和贡献一直是中医药领域复杂的科学难题。

药对是遵循药性特征、依据配伍理论形成的相对固定、相辅相成或相反相成的有机组合。应用现代科学技术从多角度、多层面进行药对组成结构、配伍效应、物质基础、量-效关系等方面的关联研究，揭示其科学内涵和配伍规律，有利于中医药同道更为清晰、深刻地认识中药药对配伍关系，有利于提高中医临床用方用药的安全性和有效性，以指导临床合理用药。通过药对相互作用研究（图 1）以及药对在方剂中的地位和关联关系探讨，有利于客观认识和深化理解方剂配伍规律。因此，重视药对研究，尤其是重视药对在方剂配伍中的地位和作用研

究，建立和遵循从单味药—药对—基本方—类方体系的由简单到复杂、由浅入深、逐层递进的研究思路和方法，将有利于科学客观地阐明中医方剂的丰富内涵，有利于发现和揭示方剂复杂体系中蕴涵的规律集，从而有利于将中医药科学研究逐步引向深入。

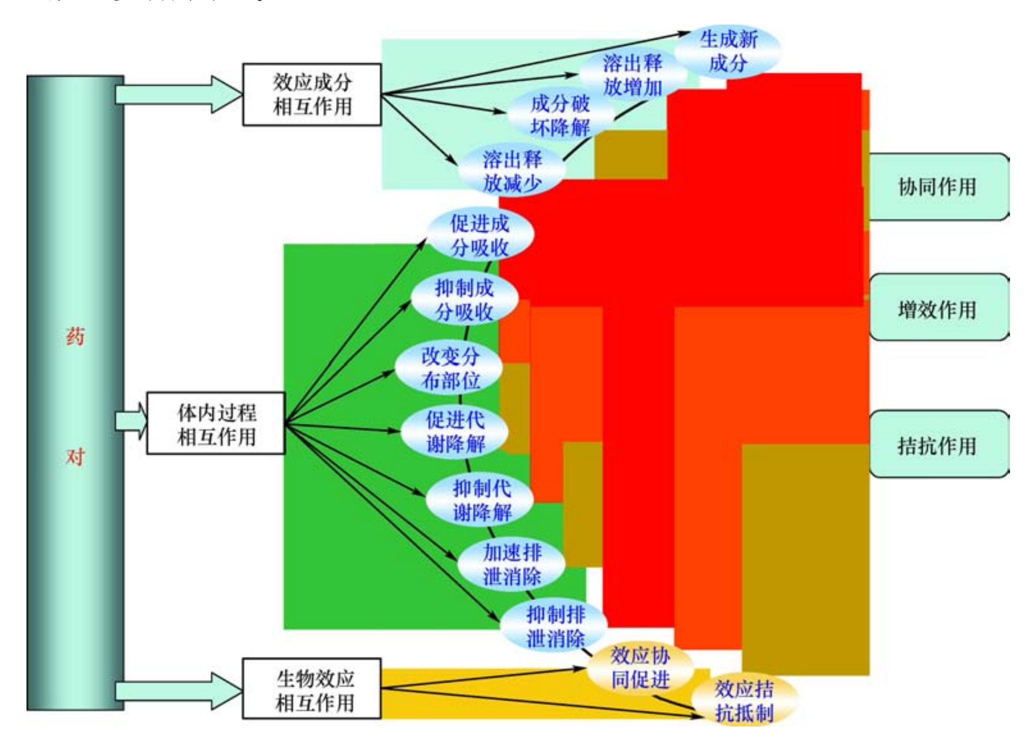


图1　中药药对相互作用研究模式

参 考 文 献

段金廒，宿树兰，唐于平，等. 2009. 中药药对配伍组合的现代认识. 南京中医药大学学报，25(5)：330～333

宿树兰，华永庆，段金廒，等. 2009. 当归-川芎挥发性成分与其抗子宫痉挛活性相关性分析. 中国实验方剂学杂志，15(2)：64～67

唐于平，段金廒，郭盛，等. 2009. 药对量-效关系的认识与思考. 南京中医药大学学报，25(1)：21～23

王欢，唐于平，郭建明，等. 2010. 当归-川芎药对不同配比组方对家兔血小板聚集和凝血功能的影响. 中国实验方剂学杂志，16(2)：81～85

武彦文，孙素琴，肖小河，等. 2009 黄连-吴茱萸药对不同配伍方式的红外光谱研究. 光谱学与光谱分析，29(7)：1797～1800

周卫，宿树兰，刘培，等. 2010. 蒲黄-五灵脂药对活血化瘀生物效应的比较研究. 南京中医药大学学报，26(3)：35～40

Gao QT, Jerry KH Cheung, Roy CY Choi, et al. 2008. A Chinese herbal decoction prepared from Radix Astragali and Radix Angelicae Sinensis induces the expression of erythropoietin in cultured Hep3B cells. Planta Med, 74(4): 392～395

Gao QT, Roy CY Choia, Anna WH Cheung, et al. 2007. Danggui Buxue Tang—a Chinese herbal decoction activates the phosphorylations of extracellular signal-regulated kinase and estrogen receptor a in cultured MCF-7 cells. FEBS Letters, 581(2): 233～240

Tang YP, Zhu M, Yu S, et al. 2010. Identification and comparative quantification of bio-active phthalides in essential oils from Si-Wu-Tang, Fo-Shou-San, Radix Angelica and Rhizoma Chuanxiong. Molecules, 15(1): 341～351

撰稿人：段金廒　唐于平　钱大玮

南京中医药大学

中药性味理论的研究

Studies on the Property and Flavor of TCM

中药药性理论是中医理论的重要组成部分和中医药特色的突出体现，是对辨证论治临床用药经验的高度概括，是药物与人体交互作用结果的集中体现和总结，内涵丰富而复杂。其中，中药性味理论最为重要，是中药药性理论的核心。阐明中药性味理论的科学内涵，对于促进中医药学发展，丰富中医药理论内容，创新中医药学术思想，指导临床配伍、方剂调配、合理用药和新药创新等均具有重大的意义。

为了既能真正认识中医药的科学价值，又能准确把握中医药的特色优势，中药性味理论成为中医药学者共同关注的科学问题。国内学者在此方面已经开展了众多研究，试图从不同角度阐明中药性味理论的科学内涵。迄今，基本能够获得共识是，中药的四性是从药物的作用性质上对药物多种医疗作用的高度概括，即四气是抽象的作用特性并不代表具体作用，离开了具体的药物和功效，四气就很难具有确定的意义。而中药的五味则不仅表示味觉感知的真实滋味，更主要的是反映药物的实际功效。每种中药都具有其各自独特内涵的性与味，药性和药味从不同角度说明药物作用，二者合参才能较全面地认识药物的作用和性质。

在此之前的中药性味的现代研究，主要集中在药性与药味的科学内涵的阐释上，并已经取得了一些重要的研究成果。例如，在药性方面，发现四性与神经系统特别是自主神经系统功能、代谢功能、内分泌系统功能及与微量元素之间等存在一定的规律。在药味方面，发现药味与其化学成分密切相关，而中药的化学成分又是其产生药理作用的物质基础，且呈现一定的规律性。这些成果为今后的中药性味理论研究奠定了重要的基础。

但是，这些研究结果还仅仅是一些探索性的工作，距离阐明中药性味理论这一目标仍很遥远。其难点主要体现在如何阐释中药药性与药味的本质是否存在简约的共性？如何寻找和建立适于中药复杂体系与特点的、能对药性与药味科学内涵进行科学解析的有效途径及方法？药味与药性的科学内涵是什么？药味与药性（气）之间的关系如何？性味与其他药性之间又存在什么样的联系？并且由于多数中药的味是复合的而不是单一的，中药性味与功效又常常是在中药相互配伍中得以体现的，因此如何在具有复合药味的中药中以及在方剂中辨识某一具体药味

的功效等，这些都给研究千姿百态的中药性味工作带来极大的困难。特别是以往的研究实践表明，不充分考虑中药特点的、简单的成分分析的研究思路虽有其价值，却可能是一条极其漫长的道路。仅靠这种方法，以往医疗经验已经证明的许多中药治疗成果的内在机制揭示与我们的期待还相去甚远。这其中除了研究需要付出的必要的时间代价之外，也表明了探讨新的研究思路的必要性。而这种新思路就必须充分重视中医药理论的特点，重新审视以往的研究，密切结合临床经验，从简单的线性思维转向多维的复杂系统思维，从大处着眼、小处入手，探讨建立新的研究模式。

这种意义重大而又充满挑战的中药性味理论研究，注定会吸引着立志献身中医药事业的科技工作者为其不懈地苦苦探索。

令人欣喜的是，越来越多的有识之士从对过去经验的深刻反思中，已经认识到为寻求更为切合中医药特点的研究方法，迫切需要理论和方法上的创新，开始探索中医药研究思路与方法的革新。不少学者借鉴系统科学、生物信息学、复杂性研究等现代科学前沿研究成果，相继提出了“一药二气”说、中药四性“性-效-物质三元论”假说、药性与化学成分、机体状态及生物学效应“三要素”假说、“药效团药性”假说、分子药性假说、中药四性的生物热力学研究等新学说和研究方法等的提出，正是在总结了正反两方面的历史经验的基础上的可贵探索，并且已经得到了一些富有启发性的结论。

在近年提出的众多中药性味理论新假说和新的研究方法中，中药一味一性，“一药 X 味 Y 性（$Y \leqslant X$）”的新假说，以及基于中药性味可拆分性和可组合性的研究方法与思路而探索构建的中药性味理论研究新模式，实现了药性研究与药味研究的有机结合，性味物质基础与药效药理、药物之间及药物与机体之间相互作用研究的有机结合，不仅适于单药味中药，更适于复合药味中药的性味研究。其主要研究内容与研究程序如图 1 所示。

中药的性味，不仅标明了中药所具有的功能，实质上也标明了相应的物质基础。中药性味的物质性，表明其一定具有可拆分性和可组合性，即作为性味的物质基础是可拆分的，拆分后与性味功效建立起一定的对应关系的物质基础又应当是可组合的。建立在较为彻底的成分分析基础上的对于药物性味的分析结论，通过重新的组分组合，应当可以再现中药或方剂的固有功效优势。结合系统科学、生物信息学、现代化学、分子生物学、药理学、基因组学、蛋白质组学、代谢组学及现代医学等现代科学前沿理论及采用现代多学科的先进技术，通过对其物质基础及其作用机制等进行深入的相关系列研究，可以达到解析与其相应的性和味的科学内涵的目的。

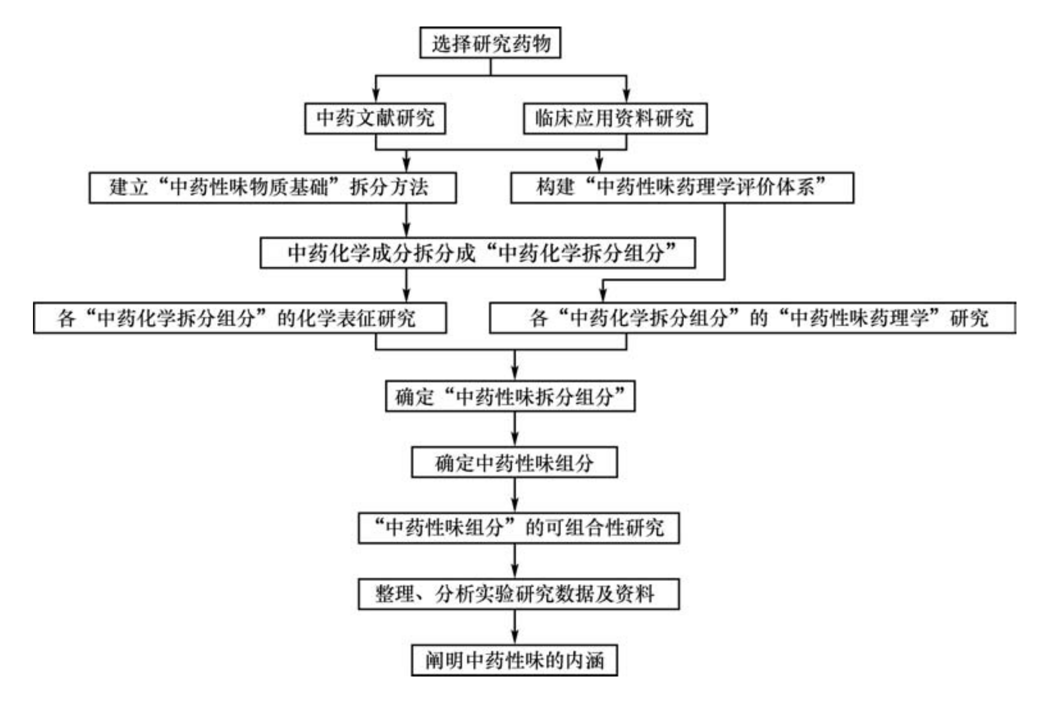


图 1　中药性味可拆分、可组合、研究模式

基于以上中药性味理论研究新模式开展中药性味理论研究，涉及“中药化学拆分组分”、“中药性味拆分组分”、“中药性味组分”、“中药性味物质基础”、“中药性味药理学评价体系”以及“中药性味组分组合”等新概念。这些概念的共同特点在于，无论是物质基础分析、药理研究，还是新药研发，它们都与中药性味理论紧密联系，都是直接与中药具体性味相对应的，都是围绕阐明中药性味的科学内涵而开展研究的。这些概念与中药“一味一性，一药 X 味 Y 性（$Y\leqslant X$）”的性味理论新假说以及中药性味可拆分性、可组合性研究方法等一起，将进一步构建、完善中药性味理论研究的新思路和新模式。

按照这种研究新模式已经对中药吴茱萸、麻黄及洋金花等进行了性味研究，并取得了满意的研究结果，同时也证明这种研究新模式是可行的。尽管目前的研究实例还很有限，研究深度也还有待提高，但已经为提出的中药“一味一性，一药 X 味 Y 性（$Y\leqslant X$）”的中药性味理论新假说的客观性展现出了令人乐观的前景。

在新的时代背景下，在新的研究条件下，在一个正在形成的日益多元的中医药研究体系中，集结多学科力量，引进高端前沿科学技术，重视复杂系统研究方法，对于在中药药性理论中居于中心地位的性味理论的内涵重新进行系统深入的分析、研究，构成了当今中医药研究最为突出的特征，也为中医特色鲜明的中药

药性理论研究提供了很好的思路启示和技术准备，预示着中药现代研究在不太远的将来会出现新的突破。这也充分体现着以中医药为主体，全面利用现代科学手段发展中医药事业以贡献于人类医学科学的时代要求。

参考文献

肖小河.2010.中药药性寒热差异的生物学表征.北京:科学出版社,20～164

高晓山.1992.中药药性论.北京:人民卫生出版社,161～162

匡海学,程伟.2009.中药性味的可拆分性和可组合性研究——中药性味理论新假说与研究方法的探索.世界科学技术——中医药现代化,11(6):768～771

匡海学,王艳宏,王秋红,等.2011.基于中药性味可拆分性和可组合性的中药性味理论研究新模式.世界科学技术——中医药现代化,13(1):25～29

李爱秀.2007.中药"药效团药性假说"的提出.天津药学,19(2):41～44

李石生,邓京振,赵守训,等.2000.中药现代化研究的关键在于建立科学的现代中药理论体系——分子药性假说的提出.中国中西医结合杂志,20(2):83

欧阳兵,王振国,李峰,等.2008.中药四性"性-效-物质三元论"假说及其论证.山东中医药大学学报,32(3):182～183

王纪常.2002.中药性味理论探析.安徽中医学院学报,21(1):4～6

张冰,林志健,翟华强.2008.基于"三要素"假说研究中药药性的设想.中国中药杂志,33(2):221～223

张廷模,王建.2005.浅析中药药性"一药二气"说.时珍国医国药,16(11):1153～1154

撰稿人：匡海学

黑龙江中医药大学

中药效应物质分子与体内效应靶群网络关系研究

Study of the Network Relationship Between TCM Bioactive Molecules and the Effective Targets

中药通过多成分、多靶点、多途径整合发挥治疗作用，但中药效应物质分子与体内效应靶群的网络关系目前还不甚清楚。开展相关研究对于阐释传统中药独特临床疗效的分子机制和中药传统理论的微观本质具有重要意义。此外，中药效应物质往往具有不同于西药单体的作用靶点，通过中药效应物质与其体内作用靶点相关研究有望发现新药物靶点，为中药创新性药物设计奠定基础。

中药效应物质分子与体内效应靶群的网络关系包括：中药效应物质分子与结合靶分子的关系、中药效应物质与靶分子介导的效应网络关系。这种复杂网络关系的产生途径分解如下：①中药化学成分被吸收进入机体，其原型及活性代谢产物通过血液循环分布至机体的组织/器官/细胞；②中药效应物质与空间结构具有互补性的大分子蛋白质发生作用——“中药活性成分”与其“靶蛋白”（网络的起点）相互结合，引起靶蛋白的空间结构或功能发生变化；③靶蛋白进一步作用于其“对接分子”（蛋白质/核酸/酶底物，网络的上游）；④靶蛋白的对接分子激活“下游生物途径”（下游网络）；⑤多个“药效执行分子”（网络终端）发挥药理效应；⑥中药活性成分被代谢、排泄。

在上述作用途径中，中药效应物质对细胞内信号转导和相关分子指标的影响已有较多研究报道。尤其是采用 Western blot、实时定量 PCR、RNA 干扰等分子生物学技术，一些中药对某些信号分子途径的影响已被确定。采用基因组学（如基因芯片）、代谢组学（HPLC-MS/MS）和生物信息学的技术，一些中药活性成分的效应网络也已被初步构建。这些方法和技术从不同角度推进了对中药效应物质分子与体内效应靶群复杂网络关系的认识，但是网络途径的功能解析、实验确证甚至于多网络间有机整合还非常困难，特别是对中药活性物质特异性的作用网络的鉴定还有待深入研究。

与中药活性物质直接结合的靶分子是中药特异性效应网络的源头和触发点，是中药与机体复杂网络间作用的衔接点和枢纽。直接作用靶点（非间接）的发现对于特征中药效应物质分子与体内效应靶群复杂网络关系的研究具有重要意义。蛋白质组学（双向电泳、多维液相色谱-质谱）是药物靶点筛选的一种有效方法。一类海洋天然产物 bengamides，通过双向电泳发现了其直接结合的靶蛋白甲硫氨酸氨基肽酶（MetAps），通过 RNA 干扰改变了 MetAps 的活性，高分辨共结

晶结构分析显示 bengamides 与 MetAps 的空间结合方式和三个关键的分子间氢键。此外，计算机分子模拟也是深入认识中药活性成分与蛋白质相互作用的一种方法。分子对接（molecular docking）是依据配体与受体作用的“锁-钥原理”，模拟其相互作用。这种分子识别的过程主要包括静电作用、氢键作用、疏水作用、范德华作用等。通过计算预测两者间的结合力、结合键、结合位点、结合构象等。近年发展的反式分子对接 INVDOCK 技术，以中药活性成分为探针，搜索 PDB 蛋白库中的与其直接结合的靶蛋白。采用这一高效率的方法，一些小分子的结合靶点已被发现并进行了共结晶 X 射线衍射的确证。噬菌体展示技术、药物印迹、亲和色谱法也是药物靶点鉴定的有力工具。

蛋白质-蛋白质的相互作用是蛋白质科学的热点领域，对阐释中药效应物质分子与体内效应靶群网络关系具有重要作用。酵母双杂交系统、串联亲和纯化法、荧光共振能量转移、表面等离子共振技术，以及化学交联结合质谱等研究手段的应用，使得许多蛋白质间互作关系被呈现，并构建了蛋白质相互作用数据库。基于已公布的蛋白质互作数据库，对分析中药活性成分的效应靶点所介导的靶群网络提供了良好的研究基础。

目前，中药活性物质与体内效应靶群网络关系不清楚。研究应选择具有丰富经验积累且临床疗效确切的中药效应物质分子为对象，系统整合现代生物信息学、分子生物学与药物靶点发现、筛选和确证的技术，对活性分子的关键靶标进行确认，并深入分析靶点介导的药效传递网络，这些对阐释中药传统功效的科学内涵是必要的。直接作用靶点的鉴定是研究的难点所在，由于已有方法存在的局限性，仍然需要更多新颖且有效的药物靶点发现技术。

参 考 文 献

黄玉芳，金坚，肖君华，等. 2008. 应用噬菌体展示技术筛选中药的药物靶点蛋白研究进展. 南京中医药大学学报，24(1)：68～70

Cai J, Chen K, Jiang H, et al. 2006. Peptide deformylase is a potential target for anti-Helicobacter pylori drugs: reverse docking, enzymatic assay, and X-ray crystallography validation. Protein Sci, 15(9): 2071～2081

Raman K. 2010. Construction and analysis of protein-protein interaction networks. Autom Exp, 2(1)

Towbin H, Eck MJ, Kim S, et al. 2003. Proteomics-based target identification: bengamides as a new class of methionine aminopeptidase inhibitors. J Biol Chem, 278(52): 52964～52971

Zhang XW, Chen SJ, Chen Z, et al. 2010. Arsenic trioxide controls the fate of the PML-RARα oncoprotein by directly binding PML. Science, 328(5975): 240～243

撰稿人：段金廒　马宏跃　郭建明

南京中医药大学

炮制所致中药药性变化科学内涵的揭示

Revelation of the Scientific Connotation of the Changes in the Property of TCM by Processing

1. 背景

中药炮制是非物质文化遗产，是中药区别于天然药物的重要标志。中药炮制的作用主要是减毒增效，其核心是炮制所致药性的变化。

中药药性主要是四气五味、升降浮沉、归经、补泻、有毒无毒等，早在《神农本草经》就提出了，一直是指导临床用药的基本理论。中药的治病、中医的疗法均依赖于药性，所谓“热者寒之、寒者热之”，药性在中医辨证施治中发挥着重要作用。在正常治疗时，药性适中之品，可直接应用；但嫌药性太过或不足时，则需要通过炮制来解决。因为“太寒伤阳，太热伤阴，过酸损齿伤筋，过苦伤胃耗液，过甘生湿助满，过辛损津耗气，过咸易助痰湿”，所以要制其太过、扶其不足，以改变或缓和药性。药性及炮制所致药性的变化迄今为止，仍没有得到很好的科学解释。药性的科学内涵本身就是个难题，而炮制所致药性的变化就更是难题之难题。

2. 科学意义

药性是中药理论的核心，是中药治病的依据。药性的寒凉与温热、升浮与沉降均可用炮制的方法来增强或缓和。然而炮制对药性究竟造成哪些成分的变化，目前尚不清楚。同样是黄连用辛热的黄酒来炮制可以缓和寒性，若用寒凉的胆汁来炮制就可增强寒性，临床上可以明显体现出此作用，但其中到底发生了哪些变化，其原理与科学内涵是什么还不清晰。正如清代徐灵胎在《医学源流论》中所提出的：“凡物气厚力大者，无有不偏；偏则有利必有害。欲取其利，而去其害，则用法以制之，则药性之偏者醇矣。其制之义又各不同，或以相反为制，或以相资为制，或以相恶为制，或以相畏为制，或以相喜为制。”去害取利之制法已有之，但“药性之偏者醇矣”的道理尚无人揭示。一旦我们揭示了药性的本质，揭示了炮制所致药性的变化，就可以“定性”去炮制，即根据药性采用相应的方法去炮制，则更利于临床的应用。古人已经将中药按药性分类，并建立了炮制方法，今人如何利用现代科学技术去解释药性作用的物质基础是什么，炮制改变或缓和药性的本质和作用机制是什么，对于指导临床用药将具有极大的科学意义。

3. 最新进展

（1）炮制可改变 Na^+-K^+-ATP 酶的活性：仙茅水煎液可以使红细胞 Na^+-K^+-ATP 酶的活性显著提高，酒炙后则进一步提高该酶的活性，增强温肾助阳的作用，属热者益热。寒凉药知母、黄连、黄柏、大黄等都能抑制 Na^+-K^+-ATP 酶的活性，经盐或酒炙制后，均可增加对 Na^+-K^+-ATP 酶的抑制，此为寒者益寒或以热制寒。

（2）炮制可改变儿茶酚胺的活性：儿茶酚胺是人体内的重要激素及神经递质，对机体具有重要的生理功能。黄连和吴茱萸分别对儿茶酚胺产生抑制和促进的作用，所以萸黄连会缓解黄连对儿茶酚胺的抑制作用进而缓解黄连的寒性。同样酒黄连中的乙醇可以促进肾素-血管紧张素-醛固酮系统功能，使酒黄连促进儿茶酚胺类的释放，因此酒黄连也会缓和黄连对儿茶酚胺的抑制，进而缓和其寒性。

（3）中药的寒热与 cAMP/cGMP 比值有很大的关系，也就是中药通过调节 cAMP/cGMP 比值进而调节人体的寒热状况。如知母可以调节 β 受体 cAMP、M 受体 cGMP 两系统间的平衡，用以改善脑内自由基代谢等情况。炮制也可以改变中药中 cAMP/cGMP 比值从而影响药性的变化。

4. 主要难点

炮制影响药性主要是从制和反制。从制包括：热者益热、寒者益寒、升者益升、降者益降；反制包括：以热制寒、以寒制热、生升熟降、生降熟升。这些制法的科学内涵、作用机制将成为炮制所致药性变化的主要难点。

（1）寒者益寒与热者益热：黄连寒性偏盛，当临床上遇有大热之症，仍有嫌其寒性不足之时，需用苦寒的胆汁来炮制，更增强了黄连的苦寒之性，也就增强了其清热泻火之力，此谓“寒者益寒”。仙茅本身是热性，温肾助阳，但用于肾阳虚寒时，嫌其温热不足，故用黄酒以制之，则可增强补肾温阳之功，此谓“热者益热”。

（2）以热制寒与以寒制热：生地苦寒，具有清热凉血、养阴生津作用；加黄酒蒸制成熟地后，则转为甘温之品，具有滋阴补血、填精益髓的功效，此谓“以热制寒”。天南星辛温，善于燥湿化痰、祛风止痉；加胆汁制成胆南星后，则性味转为苦凉，具有清热化痰、息风定惊的功效，此谓“以寒制热”。

（3）生升熟降与生降熟升：莱菔子生用涌吐痰涎，炒熟后降气消痰，所谓“生用能升，熟用能降”，可谓是“生升熟降”的典型。又如香附“生则上行胸膈，外达肌肤，熟则下走肝肾，外彻腰足”。黄柏原系清下焦湿热之药，经酒制后作用向上，清上焦之热。大黄攻下导滞，酒炒可引药上行，而清头目之热。是谓“生降熟升”。

（4）升者益升与降者益降：黄连、黄芩作用于上焦心肺，经酒制后，增强上

行趋势，善清头目之热，此谓“升者益升”。黄柏、杜仲原本沉降之品，用盐制后增强引药入肾经作用，更好地发挥滋阴降火、补肾助阳的作用，可谓之“降者益降”也（图1）。

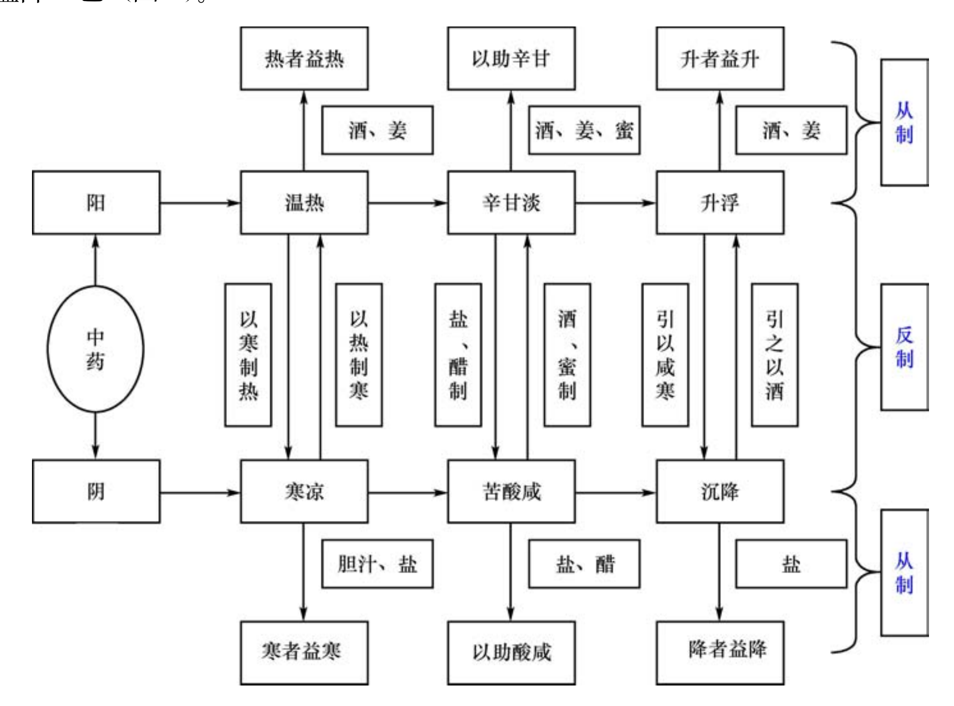


图1　炮制对中药四气五味、升降浮沉的影响

寒者益寒、热者益热、以热制寒、以寒制热、生升熟降、生降熟升、升者益升、降者益降的炮制变化实质是什么？目前尚未有人深入揭示其科学内涵，一旦用现代科学技术将炮制对药性的影响得以表征，将是对中药及中药炮制学的重大贡献。

5. 展望

炮制所致药性变化的科学内涵尚未揭示的原因是中药药性本身的科学内涵尚未揭示。将来利用各种谱学和组学的手段，弄清不同药性的作用物质和作用机制是指日可待的事情。利用谱效、谱动学找到作用物质基础，利用蛋白质组学、基因组学和代谢组学等现代科学技术，说明不同药性的作用机制，从而揭示炮制所致药性变化的科学内涵。

参考文献

邓云，马百平，从玉文，等.2008.知母及其有效成分改善脑功能药理作用研究进展.中国药理学通报，24(5):576～579

黄有霖.2003.仙茅的研究进展.中药材,26(3):225～228
贾天柱.2006.再论中药生熟的变化与作用.中成药,28(7):984～986
刘人树.2006.对中药归经理论的认识与其现代研究的看法.中国药师,9(3):268～269
杨丽蓉.2002.知母的化学成分及药理作用研究进展.国外医学·中医中药分册,24(4):207～210
Lee MK,Kim HS.1996.Inhibitory effects of protoberberine alkaloids from the roots of Coptis japonica on catecholamine biosynthesis in PC12 cells.Planta Med,62(1):31～34
Yoshizami M,Houchi H,Ishimura Y,et al.1997.Effects of evodiamine on catecholamine secretion from bovine adrenalmedulla.Med Invest,44(1～2):79

撰稿人：贾天柱
辽宁中医药大学

中药复方化学研究和质量控制

Chemical Characterization and Quality Control of Chinese Composite Medicines

中药复方是中医药的精华，众多中药复方的疗效已得到长期临床实践的检验，获得了人们的广泛认可。但是中药复方作为最复杂的一种药物形式，其化学研究和质量控制难度也大大增加，成为中医药现代化的瓶颈问题之一。中药复方的深入研究开发以及中药制剂生产水平的提高在很大程度上受到其化学研究和质量控制水平的制约。如果中药复方的药效物质基础尚不清楚，作用机制的深入研究也无从谈起，也无法确定合理的质量控制指标和标准。而中药质量控制技术的不完善，则不仅直接影响到中成药生产过程和产品的质量水平，甚至导致我们很多的中医药药理药效研究和临床疗效评价的结果受到质疑。因此，中药复方的化学研究和质量控制这一科学难题的破解也是对中药现代化发展全局至关重要的基础性工作之一。

中药复方的化学研究和质量控制的主要难点在于：

第一，中药复方化学组成的复杂性。首先是成分数目多，到目前为止我们可以从单味中药材分离鉴定出数十种成分，一个中药复方由多味中药材配伍组成可能多达数百种成分，况且还有不少未知成分可能在我们的认识之外。其次是成分种类多，在一个中药复方同时存在几大类甚至数十类有效组分。而且中药复方中各种成分含量水平差别很大，常量成分和超微量成分含量可能相差 10 个数量级。

第二，中药复方的整体性。已有很多研究表明，很多中药复方的整体疗效突出而分离的各个单一有效成分疗效并不理想，复方的整体疗效也不等于各个成分作用的线性叠加，这些事实都说明中药复方的药效物质基础是一个对配伍组成和比例可能都具有约束条件的化合物群，离开配伍关系这一约束条件去研究有效成分，则是脱离了中药复方的整体性，得出的结果也往往难以令人满意。对于这样一个药效物质群的把握我们既要强调其整体组成，也要深入研究其中的重要成分，否则就无法从分子水平阐明中药复方的药效物质和作用机制而只能停留在传统水平。

中药复方是一个海量化学成分组成的复杂系统，其中既有能够直接发挥药效的药物成分，也有本身药理作用不明显但是对复方发挥疗效起到必要的辅助作用甚至是必不可少的成分，这两类成分共同构成了复方的药效物质群，但是复方中

还存在着大量的成分对于某些功能主治基本上不起到直接或者辅助的作用，可以称为无关成分，这些无关成分与有效成分天然共存构成了复杂的中药复方物质体系。就目前的技术水平来说，我们不可能完全弄清楚一个中药复方究竟含有多少种化学成分，每种成分对复方的贡献以及各种成分之间的相互关系，对复方中所有的成分进行质量控制也是不切实际的，因此我们关注的重点应该放在复方中的药效物质群。但是由于这一药效物质群存在于一个复杂的物质体系中，如何认识、发现和科学表征这些存在于中药复方中的药效物质群，如何揭示这些药效物质群之间的配伍关系和增效减毒原理，如何对这样的多组分复杂药物体系进行科学有效的质量控制，这些科学问题的解决必须发展相适应的新策略新方法新技术。

中药复方化学和质控技术的研究的快速发展和进步得益于 20 世纪 90 年代以后我国中药现代化行动纲要的实施吸收了多学科专家的参与。90 年代中期以前，中药方剂研究主要还是两条途径：一种是借鉴先导化合物的思路，从中药中发现和分离单一有效成分开发成植物药；一种是在传统中医药理论指导下进行复方的优化配伍，但是还停留在药材配伍的层次上。这些研究可以说是分别在两个不同的化学层次进行研究的，也有把这两个层次结合起来的。但是复方整体（或药材）的层次过于模糊和复杂，研究因素难以控制，由于缺乏一个合适的中间层次或过渡层次，从复方或药材直接跳到“化学成分”层次则很容易割裂中药有效物质之间的内在联系，两个层次的研究很难统一起来。罗国安教授在 1997 年提出在中药复方研究中应该引入一个中间层次即有效部分的概念，所谓有效部分（组分）是指中药复方的药物中具有相似化学性质的一大类化合物（性质相似的化合物群），这样一个复杂的中药复方（可能有数百种化学成分）往往就可以分为几种或十来种有效部分，如和药效学相结合就有可能阐明中药复方协同配伍的化学物质基础。为此，我们提出了包括现代分离方法提取有效部分、指纹图谱定性、指标成分定量、有效部分和药效学研究相结合的整体研究思路。中药复方有效部分理论的提出也推动了中药方剂的研究从两个化学层次向三个化学层次的发展，并且中药方剂有效部分的研究很快成为中药方剂研究的一个重要方向。在有效部分理论研究的基础上提出了中药复方的化学研究体系以及中药复方物质基础和药效相关性研究的方法，通过化学与药效学研究相结合（一个“结合”），基本讲清中药复方的药效物质，基本讲清中药复方的作用机制（两个“基本讲清”），从“君、臣、佐、使”药材、有效部分、有效成分（三个“化学层次”）阐述中药复方的药效物质，从整体动物、器官组织、细胞亚细胞和分子生物学（四个“药理水平”）来研究中药复方的作用机制（简称“一二三四”体系）。对于中药复方整体的化学表征我们提出了指纹图谱方法，进而在有效部分理论指导下，通过将中药复方的各个有效部分的化学信息与药效学的活性信息进行相关分析，就可能辨

识复方中起主要药效作用的组分即有效部分（有效组分），因此最早提出了多维多息化学指纹图谱，即通过有效组分指纹图谱表征中药复方中的有效组分的化学特征。

2000 年在王永炎院士和张伯礼院士牵头和领导下，我国启动实施了第一个中药“973”项目——中药方剂的关键科学问题基础研究。中药有效部分理念和中药复方的化学研究体系也被吸收作为项目整体研究思路中化学研究的主要方法体系，项目研究成果推动了中药复方从药材配伍到有效部分（有效组分）配伍的理论发展，为从传统的中药复方中开发现代复方中药（组分中药）进行了成功的探索，获得了两项国家科技进步二等奖。

在上述研究基础上，罗国安教授总结提出了化学物质组学的研究方法。化学物质组（chemome）是指一定条件下输入生物体系的所有化学物质（化学成分）组成的复杂化学体系，中药复方化学物质组即是指所研究的中药复方包含的化学成分的集合，它还可以分为不同层次的子化学物质组。化学物质组学（chemomics）是指研究化学物质组的组成及其变化与生物体系的动态响应的相互关系的一种方法。采用“化学物质组学”可以逐层递进地揭示中药复方的化学组成信息及配伍关系，从复杂的复方化学物质体系中逐步找出和明确能够代表复方整体疗效的药效物质群（图 1）。

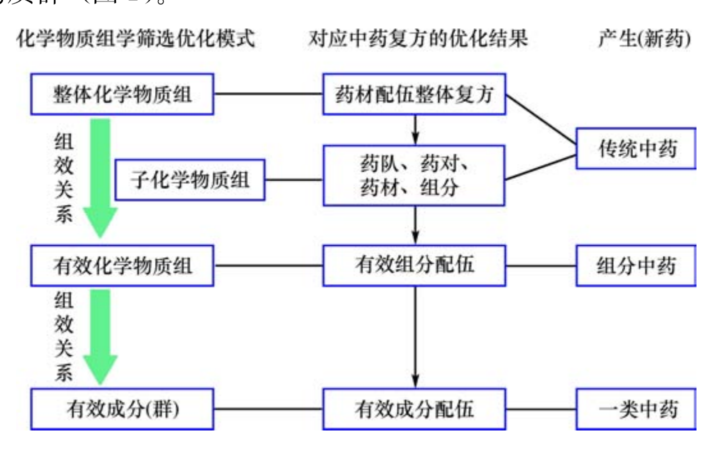


图 1　层次化的化学物质组学研究揭示中药的药效物质群

可以通过两种途径实现药效物质群的发现，最终开发组分配伍的现代复方中药，对整体中药复方用“自上而下”模式、对中药材则可以用“自下而上”模式（图 2）。

对于中药复方中药效物质群的把握我们既要强调其整体组成，也要深入到具体成分水平的研究，中药复方化学信息的表达需要将整体表征与局部特征的刻画相结合。指纹图谱与多指标成分定量技术相结合的模式是一个较好的选择，即采

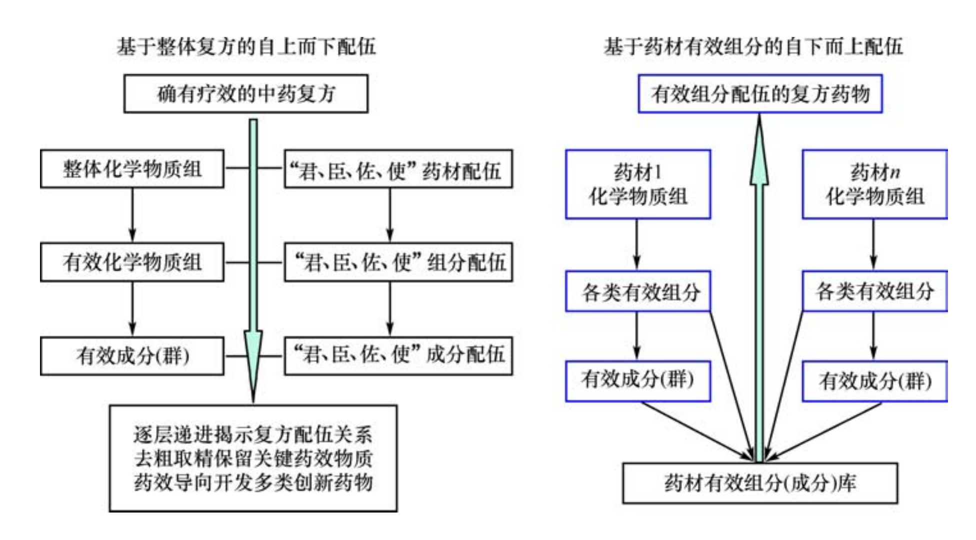


图 2　化学物质组学：自上而下、自下而上的两种应用模式

用指纹图谱整体表达中药复方物质组成的宏观特征，通过多指标成分（主要药效成分和特征成分）的定量分析来精确描述具体成分的特殊规律，这样既能充分体现中药的特色，又有利于与国际双向接轨（图 3）。

中药的质量控制和质量标准的制定应该在药效物质基础研究比较清楚的基础上进行，这样质量控制指标和参数的选择才有充分的依据，保证所建立的质量控制体系能够有效控制整体药效物质群的稳定，从而真正达到稳定药物疗效、保证安全的质量控制目标。因此，中药的质量控制应该比西药的质量控制难度更大，科技含量要求更高。中药质量控制需要结合中医药的特点，同时充分吸收西方药物质控技术的成果并加以继承创新，建立具有自主知识产权的全程化、全面性、智能化的现代中药质量控制技术体系（图 4）。

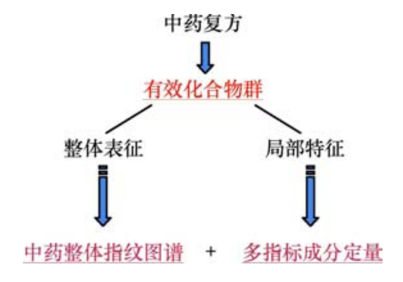


图 3　中药复方化学信息的表达模式

中药生产过程在线质量控制技术也是近年来的一个重要进展。发达国家已经将在线近红外技术作为药品生产过程中质量控制的重要手段，但都是限于西药质量控制应用。我国在中药在线质控技术研究领域处于国际先进水平。清华大学等单位已开发和掌握了近红外在线技术应用于中药提取、分离（柱层析）、浓缩、过滤、干燥、混合等各个单元操作的在线质量分析和基于质量参数（有效成分含量和指纹图谱）建模的智能化控制的关键技术（图 5），并成功应用于多个中药生产企业包括中药注射剂、口服液及固体制剂的生产过程质量控制，取得了良好的效果。

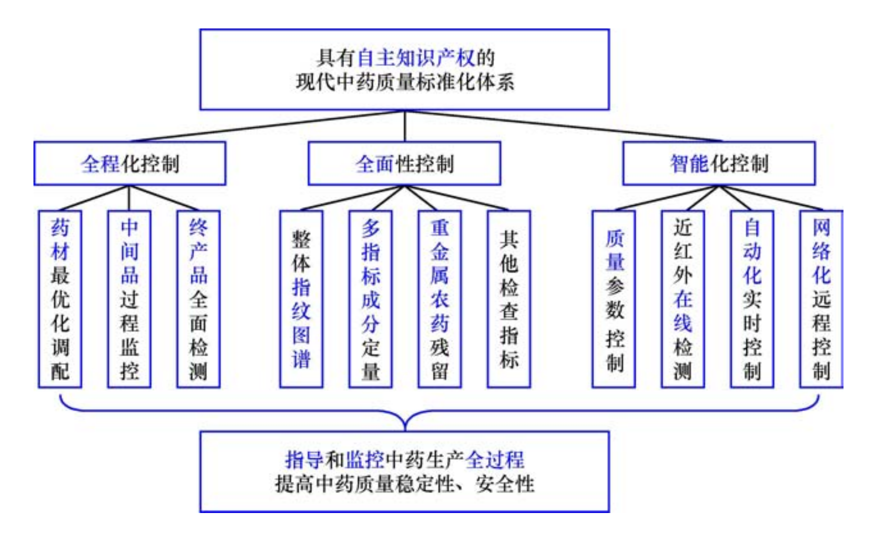


图 4　现代中药质量控制技术体系

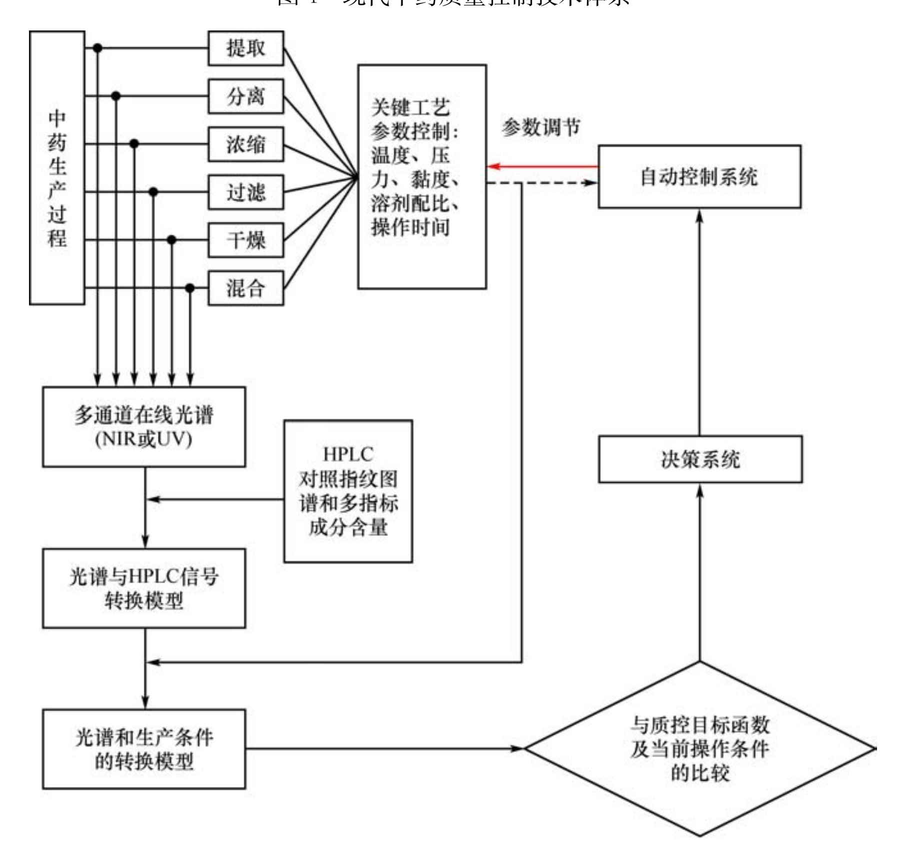


图 5　中药生产过程在线质量控制示意

参考文献

曹进,饶毅,沈群,等.2001.中药指纹图谱及其建立原则.中药新药与临床药理,12(3):200～204
罗国安,梁琼麟,张荣利,等.2006.化学物质组学与中药方剂研究——兼析清开灵复方物质基础研究.世界科学技术——中医药现代化,8(1):6～15
罗国安,王义明.1997.中药复方有效部分研究方法及理论初探.中成药,19(8):44～45
罗国安,王义明.1999.中药复方的化学研究体系.世界科学技术——中药现代化,1(1):16～19
罗国安,王义明.1999.中药复方物质基础和药效相关性研究.世界科学技术——中药现代化,1(1):11～15
罗国安,王义明,曹进.2000.多维多息化学特征谱及应用.中成药,22(6):395
罗国安,王义明,曹进,等.2002.建立我国现代中药质量标准体系的研究.世界科学技术——中药现代化,4(4):5～11
杨辉华,覃锋,罗国安,等.2007.NIR光谱的LLE2PLS非线性建模方法及应用.光谱学与光谱分析,27(10):1955～1958

撰稿人:罗国安
清华大学

中医证候的动物模型复制

TCM Syndrome Animal Model Replicate

随着科学的发展，中医药学的研究已经完全突破了长期以来以经典校注、引证发挥和临床诊治观察为主的传统模式，为了适应中医药的现代化与国际化的需求，实验研究已成为中医科学研究体系的一个重要组成部分。在现代中医药实验研究当中，中医证候动物模型的复制是开展中医证候及中药新药实验研究的一个关键问题。

中医证候动物模型是在中医药理论指导下，依据病因病机论与脏象学说，利用现代方法与技术，把人体的证候在动物身上加以模拟复制而成。

自20世纪60年代初肾阳虚证动物模型问世以来，中医证候动物模型的复制经历了近50年的发展，目前我国现已建立了40多类中医证候的动物模型。1960年，邝安坤发现过量使用肾上腺皮质激素的小白鼠表现为阳虚征象，1963年其发现用助阳药物（附子、肉桂、肉苁蓉、淫羊藿）能治疗这种状态。1964年，易宁育用六味地黄汤治疗类似阴虚的肾性高血压大鼠。同年，上海第二医学院舌象小组研究气虚（人工慢性贫血）和阴虚（高位小肠侧瘘）家兔的舌象病理组织变化，首次直接用中医证候作为模型名称。1974年山西医学院用腹腔血凝块作为瘀血模型研究宫外孕方药理。随着中医研究重点从病向证转移，中医证候动物模型的复制日益广泛与深入。1977年，上海中医学院利用肾上腺皮质激素和甲状腺素＋利血平复制小白鼠阳虚并用助阳药、滋阴药治疗，同时进行组织化学和分子生物学研究。同年，上海第一医学院研制出高分子右旋糖酐微循环血瘀模型。1979年北京师范大学张启元尝试用灌喂大黄煎剂“泻下伤脾”建立小鼠脾虚证模型。至此，肾虚、脾虚、血瘀三个证候模型开创了中医证候动物模型复制的先河，成为了中医证候动物模型复制的范式与研究重点。迄今，肾虚模型有21种造型方法，脾虚模型有19种造型方法，血瘀模型有42种造型方法。从此，各种中医证候动物模型纷纷开始建立，湖南医学院的艾叶注射肝郁模型，四川医学院的大肠埃希菌静脉注射温病卫气营血模型，梁月华的温热药、寒凉药喂饲大鼠热证、寒证模型，贲长恩的溶血性贫血血虚模型等。1981年陕西中医学院生理教研室用改变自主神经系统功能状态的药物建立类似“阳证”（阿托品）及“阴症”（利血平）模型。1984年，卫生部科教司在编写《医学实验动物模型和细胞系研制与应用》一书中，首先收录了11种中医动物模型。1987年，成都中

医学院中医实验研究组编著《中医证候动物模型实验方法》一书，详细介绍了当时已有的几十种中医证候模型，并在总论中论述了证候动物模型的定义、研究原则、动物选择、制作思路和方法。1987 年，北京中西医结合研究会基础专科委员会召开“虚证动物模型研讨会”，1988 年 10 月中国病理生理学会中医病理生理专业委员会在南昌召开“全国中医病症动物模型复制经验交流会”。1988～1990 年，中医证候动物模型的研究快速发展并取得了显著的科技成果。1988 年，由杨云主持研究的“劳倦和饥饱所致大鼠脾虚证模型”获得国家中医药管理局科技进步二等奖。至 1990 年底，有关中医动物模型实验的文献（包括期刊、内部资料、会议资料）共 689 篇，证型（包括同一证型的不同造型方法、病、证）142 种。另外，日本研制中医动物模型约有十余种，如胁肋苦满模型、激素性瘀血模型、小檗碱证模型、SAM-P 系、SAM-R 系老化肾虚模型等。其中医证候动物模型复制的特点在于注重用遗传方法来复制中医证候的动物模型。随着中医证候动物模型复制研究的不断发展，学术上日趋成熟，复制方法与技术日益提高，模型种类与数量不断增多，中医证候动物模型的复制已成为诸多新学科中更具活力的一门学科。

目前中医证候动物模型的复制大多局限在模拟临床病证形成的原因，以此病因施加在动物身上。该方法所造的中医证候动物模型值得推敲：一是中医病因多为非特异性的因素，一种病因可致多种病证，多种病因又可致同种病证，故而中医动物模型的病因与中医病证的病因很难相互吻合；二是四诊合参作为中医诊断学的基本原则之一，如何在动物身上体现出来；三是中医传统病因并不一定是能直接引起相应中医证候的客观因素，要知道综合性的病因与机体内在因素相互作用才是导致中医临床复杂证候的重要特点，单纯的外在致病因素对于中医病证的产生而言并非是直接的发病因素，多为诱发因素而已；四是人与动物之间有种属差异、生活习性亦存在不同，故情志因素所致的疾病，工作、生活的压力和人际关系等社会因素所致的疾病在动物身上难作为致病因素；五是传统病因造模时作用时间、施加强度均不易控制。

中医证候动物模型的复制尚处于探索阶段。在今后的中医证候动物模型研究过程中必须以中医理论为核心、辨证论治为基础、脏腑理论为依据、病因病机为准则，汲取现代科学的新方法与新技术，才能研制出真正的中医证候动物模型。同时，应重点考虑以下几点问题：①中医证候动物模型研究离不开中医“证”的规范化研究。动物模型如何更确切地反映中医“证候”，这是动物模型复制成功与否的关键。这个问题的解决要建立在从患者身上明确“证”的实质，使证候客观化、标准化之上，也需要结合临床及生化指标、病理形态的改变，制定出能反映“证”本质的特异性衡量指标，并综合考虑到病因、动物的优选，才能设计制作出更合适的动物模型。因此，深入开展临床研究，对“证候”的动物模型的复

制有重要作用。②利用新的方法和手段复制出更接近患者临床实际的，具有可重复性、一致性、可控性、易行性、经济性和确定性的证候模型。③从分子水平研究各种中医证候的基因特点，将证候的特定基因导入动物模型的染色体中，使动物出现类似或相同的基因表达，从而造出相应中医证候的动物模型。

参考文献

邝安坤.1963.某些助阳药对于大剂量皮质素所致耗竭现象的影响.中华内科杂志,(2):113

上海第一医学院生理室.1977.丹参治疗微循环障碍的实验研究.中华内科杂志,(4):207

上海中医学院正常人体学教研组.1977.阳虚、阴虚造型以及某些助阳药和滋阴药作用的初步研究.新医药学杂志,(9):33

王明明,张六通,丁建中,等.2010.中医证候动物模型研究方法探讨.湖北中医杂志,32(2):27～28

邢建华,翟红莉.2006.中医证候动物模型研究近况.中国疗养医学,16(2):68～69

余成浩,张宏,余葱葱,等.2007.论中医动物模型的研究思路与方法.中药药理与临床,23(5):233～235

张栋,孙静.2009.中医证候动物模型复制方法的研究.吉林中医药,29(8):655～657

张家玮,孙建宁,张爱林.2006.建立中医证候动物模型与复方药物及其整体调整效应.中医临床康复,10(5):156～158

撰稿人：李廷利

黑龙江中医药大学

编 后 记

《10000 个科学难题》系列丛书是教育部、科学技术部、中国科学院和国家自然科学基金委员会四部门联合发起的“10000 个科学难题”征集活动的重要成果，是我国相关学科领域知名科学家集体智慧的结晶。征集的难题包括各学科尚未解决的科学问题，特别是学科优先发展问题、前沿问题和国际研究热点问题，也包括在学术上未获得广泛共识、存在一定争议的问题。这次征集的农学、医学、信息科学领域的难题，正如专家们所总结的“一些征集到的难题在相当程度上代表了我国相关学科的一些主要领域的前沿水平”。当然，由于种种原因很难做到在所有研究方向都如此，这是需要今后改进和大家见谅的。

“10000 个科学难题”征集活动是由四部门联合组织在国家层面开展的一个公益性项目，这是一项涉及我国教育界、科技界众多专家学者，为我国教育和科学技术发展、创新型国家建设，特别是科技文化建设添砖加瓦，功在当代、利在千秋、规模宏大、意义深远的工作。数理化难题编撰的圆满成功，天文学、地球科学和生物学领域难题的顺利出版，这六卷书获得的专家好评和社会认同，为农学、医学和信息科学三卷书的撰写提供了宝贵经验。

征集活动开展以来，我们得到了教育部、科学技术部、中国科学院、国家自然科学基金委员会有关领导的大力支持，教育部原副部长赵沁平亲自倡导了这一活动，教育部科学技术司、科学技术部科研条件财务司、中国科学院院士工作局、国家自然科学基金委员会计划局、教育部科学技术委员会秘书处、中国农业大学、浙江大学和北京邮电大学为本次征集活动的顺利开展提供了有力的组织和条件保障。由于此活动工程浩大、线长面广、人员众多，篇幅所限，书中只出现了一部分领导、专家和同志的名单，还有许多提出了难题但这次未被收录的专家没有提及，还有很多同志默默无闻地做了大量艰苦细致的工作。如教育部科学技术委员会秘书处彭倚天、彭树立、刘超，中国农业大学龚元石、李红军、凌遥、郑艳萍，北京林业大学田振坤，扬州大学房东升，中国水产科学院黄海水产研究所刘志鸿，湖南农业大学谭太龙，华中农业大学伍新玲，浙江大学陈昆松、项品辉、章成伟、程术希、蒋国平、曹红翠、杜维波、章益民、吴健，清华大学吴晓爱、孙玉娜，中华预防医学会田传胜，天津中医药大学康立源、薛晓娟，北京邮电大学杨放春、刘杰、李冬梅，北京大学郝丹，哈尔滨工业大学刘明岩，以及科学出版社王海光、沈红芬、孙芳等，总之，系列丛书的顺利出版是参加这项工作的所有同志共同努力的成果。在此，我们一并深表感谢！

《10000 个科学难题》丛书农、医、信息科学编委会

2011 年 3 月